



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

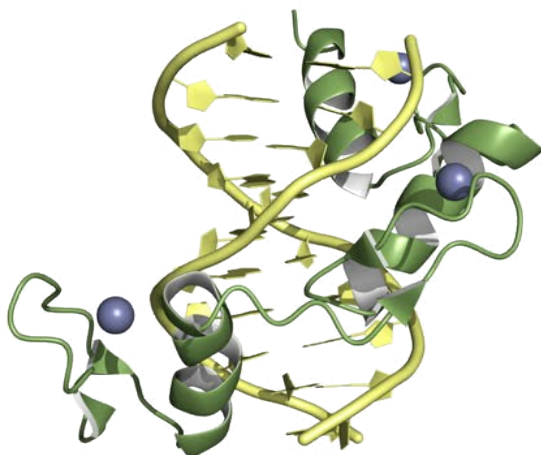
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Διπλωματική Εργασία

**Τίτλος «Επίπεδα Μετάλλων, Γενετική Ποικιλομορφία και Συσχέτιση με τη
Μη Αλκοολική Λιπώδη Διήθηση Ήπατος»**

Διαμαντόγλου Ιωάννης



Αθήνα, 2018

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Δεδούσης (Επιβλέπων)

**Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Μέλη

**Νικόλαος Καλογερόπουλος
Καθηγητής**

**Γεώργιος Παπανικολάου
Επίκουρος Καθηγητής**

**«Επίπεδα Μετάλλων, Γενετική Ποικιλομορφία
και Συσχέτιση με τη Μη Αλκοολική Λιπώδη
Διήθηση Ήπατος»**

Ο Διαμαντόγλου Ιωάννης

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και, από όσο γνωρίζω, η εργασία μου δεν 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 την ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο, καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ. Δεδούση Γεώργιο, αρχικά, για την ευκαιρία που μου έδωσε ώστε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα και, επιπλέον, για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας, ώστε να πραγματοποιηθεί όσο το δυνατόν πληρέστερα.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτωρ Καλαφάτη Νάνα που αφιέρωσε μέρος του πολύτιμου χρόνου της, ώστε να με βοηθήσει να οργανώσω και να συλλέξω τις απαραίτητες πληροφορίες για την εργασία, καθώς και για τη συνεχή υποστήριξη που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια διεξαγωγής της. Η βοήθεια της ήταν καθοριστική.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η NAFLD είναι μία διαταραχή της αποθήκευσης των ηπατικών λιπιδίων. Οι γενετικοί παράγοντες συμβάλουν καθοριστικά στην εξέλιξή της. Επιπλέον, είναι καταγεγραμμένη η επίδραση των επιπέδων μετάλλων στη νόσο, καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ επιπέδων μετάλλων στο αίμα και διαφόρων πολυμορφισμών προς αυτή. Το Cs, συγκεκριμένα, αποτελεί ένα μέταλλο που προκαλεί μεταβολική δυσλειτουργία, ενώ ο Zn είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ηπατική λειτουργία. Επίσης, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του Zn και της CRP, που αποτελεί δείκτη φλεγμονής κατά τη NAFLD.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αποτίμηση της επίδρασης των επιπέδων μετάλλων, καθώς και των αλληλεπιδράσεων των επιπέδων μετάλλων με γενετικούς πολυμορφισμούς, σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) στην Ελλάδα. Στη συνέχεια θα γίνει αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα επίπεδα μετάλλων ως προς τις τιμές CRP.

Υλικά-Μέθοδος: Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πληθυσμός 189 ατόμων με αναλύσεις σε μέταλλα, εκ των οποίων 113 γυναίκες και 76 άνδρες. Από αυτούς, οι 119 ήταν ασθενείς και οι 70 υγιείς. Πραγματοποιήθηκε βιοχημική ανάλυση, καθώς επίσης αιματολογική και γενετική ανάλυση. Οι 16 πολυμορφισμοί που ελέγχθηκαν ήταν οι εξής: rs1801133, rs1801282, rs475106, rs864745, rs13266634, rs11558471, rs3758391, rs5219, rs11076160, rs7190725, rs1599823, rs11868035, rs991804, rs459617, rs455804, rs2833479. Τα άτομα διαχωρίστηκαν σε μη φορείς και σε φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου.

Αποτελέσματα: Καθοριστικό ρόλο, όσον αφορά τη νόσο NAFLD, φαίνεται ότι έχει η ηλικία (ΣΛ: 1.086, ΔΕ: 1.044-1.131, p: 0.000) και ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΛ: 1.458, ΔΕ: 1.255-1.693, p: 0.000). Επίσης, οι τιμές Cs στο αίμα παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τη NAFLD (ΣΛ: 1.441, ΔΕ: 1.245-1.667, p: 0.0008), ενώ τα επίπεδα Cs παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα Zn (β : -202.978, ΔΕ: -405.293-(-)0.663, p: 0.049). Επιπλέον, φαίνεται ότι οι τιμές Zn στο αίμα δεν επηρεάζουν τις τιμές CRP (β : 0.000, ΔΕ: -0.002-0.002, p: 0.803). Ακόμα δεν καταγράφηκε κάποιος από τους 16 πολυμορφισμούς με στατιστική σημαντικότητα σχετικά με την αλληλεπίδρασή του με τις συγκεντρώσεις Zn, Cs στο αίμα και επίδραση στη NAFLD. Κανένας από τους 16 πολυμορφισμούς δεν επιδρά στις τιμές CRP, έπειτα από έλεγχο για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ και νόσο NAFLD. Τέλος, οι πολυμορφισμοί rs13266634 και rs11558471 του γονιδίου SLC30A8 δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα σχετικά με αλληλεπίδραση με τις τιμές Zn στο αίμα και επίδραση στη CRP, έπειτα από έλεγχο για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ και νόσο.

Συμπεράσματα: Αναγνωρίστηκε ότι τα επίπεδα Cs στο αίμα παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τη NAFLD, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα Zn. Δεν ταυτοποιήθηκε κάποιος από τους 16 πολυμορφισμούς που σχετίζεται με τη NAFLD να αλληλεπιδρά με τα επίπεδα μετάλλων στο αίμα ως προς τη νόσο. Επίσης, οι τιμές Zn στο αίμα δεν επηρεάζουν τις τιμές CRP. Ακόμα κανένας από τους 16 πολυμορφισμούς δεν επιδρά στις τιμές CRP. Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι οι πολυμορφισμοί rs13266634 και rs11558471 του γονιδίου SLC30A8 δεν αλληλεπιδρούν με τις τιμές Zn, Cs και Tl στο αίμα και, εν τέλει, στα επίπεδα της CRP.

Λέξεις-κλειδιά: Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, γονίδιο SLC30A8, γονίδιο, αλληλεπίδραση γονιδίων, ψευδάργυρος, καίσιο, θάλλιο, ινσουλίνη, CRP.

ABSTRACT

Introduction: NAFLD is a disorder of liver lipid storage. Genetic factors contribute decisively to its development. In addition, the effect of metal levels on the disease, as well as the interaction between blood metal levels and various polymorphisms to it, are documented. Cs in particular is a metal that causes metabolic dysfunction, while Zn is essential for normal liver function. There is also a correlation between Zn and CRP, which is a marker of inflammation in NAFLD.

Purpose: The aim of the present study is to evaluate the effect of metal levels and the interactions between metal levels and genetic polymorphisms in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in Greece. An evaluation of the interaction between polymorphisms and metal levels in respect to CRP values will then be performed.

Materials-Method: The study included a population of 189 individuals who had metal analyses, out of which 113 were female and 76 were male. Out of these individuals, 119 were sick and 70 healthy. Biochemical analysis, haematological and genetic analysis were performed. The 16 polymorphisms tested were: rs1801133, rs1801282, rs475106, rs864745, rs13266634, rs11558471, rs3758391, rs5219, rs11076160, rs7190725, rs1599823, rs11868035, rs991804, rs459617, rs455804, rs2833479. Individuals were segregated into non-carriers and vectors of risk alleles.

Results: Age appears to be a determining factor in NAFLD (SL: 1.086, CI: 1.044-1.131, p: 0.000) as well as body mass index (SL: 1.458, CI: 1.255-1.693, p: 0.000). Also, Cs values in the blood have a positive correlation with NAFLD (SL: 1.441, CI: 1.245-1.667, p: 0.0008), while Cs levels show a negative correlation with Zn levels (β : -202.978, CI: -405.293-(-)0.663, p: 0.0.49).

Conclusions: It was recognized that blood levels of Cs are positively correlated with NAFLD but there is a negative correlation with Zn levels. None of the 16 NAFLD-related polymorphisms was found to interact with the levels of metals in the blood in respect to the disease. Also, blood Zn values do not affect CRP values. Moreover, none of the 16 polymorphisms affects CRP values. This study showed that the rs13266634 and rs11558471 polymorphisms of the SLC30A8 gene do not interact with Zn values, Cs and T1 in the blood, and ultimately with CRP levels.

Key words: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, SLC30A8 Gene, Gene Interaction, Zinc, Cesium, Thallium, Insulin, CRP.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
T2DM	Type 2 Diabetes mellitus
NASH	Nonalcoholic Steatohepatitis
HCC	Hepatocellular carcinoma
MetS	Metabolic syndrome
NAFL	Nonalcoholic Fatty Liver
SNP's	Single nucleotide polymorphisms
CVD	Cardiovascular disease
NAS	NAFLD activity score
TGF-β1	Transforming growth factor-beta1
ZnT	Zinc Transporter
MT	Metal-Proteins
ZIP	Irt-like protein
MMPs	Matrix metalloproteinases
MTF1	Metal regulatory transcription factor 1 i
HSCs	Hepatic stellate cells
Mees	Leukonychia striata
DNS	De novo Lipogenesis
DM	Diebetes Melitus
CDE	choline-deficient, ethionine-supplemented Diet
GCs	Glucocorticois
FFA	Fat Free Acids
ROS	Reactive Oxygen Species
IR	Insulin Resistance
GSH	Glutatheonene

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD)

1.1.1 Μη Αλκοολική Λιπώδης Διήθηση - Ορισμός

Η NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) είναι μια διαταραχή της αποθήκευσης των ηπατικών λιπιδίων, που εκδηλώνεται είτε ως απλή στεάτωση είτε ως NASH (Non Alcoholic Steatohepatitis), η οποία χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ηπατικού λίπους συνοδευόμενη από φλεγμονή και η οποία μπορεί να προχωρήσει έπειτα από αρκετά χρόνια σε προηγμένη ηπατική νόσο. Η NAFLD, η οποία αναπτύσσεται παρουσία σχετικά χαμηλής κατανάλωσης αλκοόλ, συνήθως <14 μονάδες την εβδομάδα, θεωρείται πλέον ως ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου (MetS). Η διάγνωση του MetS απαιτεί την παρουσία τριών από τους πέντε παράγοντες: υπερτριγλυκεριδαιμία, χαμηλές συγκεντρώσεις λιποπρωτεΐνης-χοληστερόλης υψηλής πυκνότητας (HDL-C), κεντρική παχυσαρκία, υπέρταση και υπεργλυκαιμία νηστείας (Sumner, 2008). Αξιοσημείωτο είναι ότι σε κάποιες περιπτώσεις η εμφάνιση της NAFLD δεν συνδέεται με την IR και τα χαρακτηριστικά του MetS, κάτι το οποίο οφείλεται στην παρουσία συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών οι οποίοι μεσολαβούν με διαφορετικό μηχανισμό στην εμφάνιση της NAFLD (Wainwright et al., 2016).

1.1.2 Επιδημιολογία

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι μια ταχέως αυξανόμενη ασθένεια σε όλο τον κόσμο, με τις εκτιμήσεις για τον επιπολασμό της να κυμαίνονται μεταξύ 20%-50% (Lee et al., 2007; Browning et al., 2004; Bellentani et al., 2000), ανάλογα με τον πληθυσμό της μελέτης και τον χρησιμοποιούμενο ορισμό για τη διάγνωση. Ο επιπολασμός της NAFLD είναι υψηλότερος σε πληθυσμούς με MetS και προϋπάρχουσες μεταβολικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας και του διαβήτη τύπου 2 (T2DM).

Οι μελέτες οι οποίες διερευνούν το ιστορικό ατόμων με NAFLD έχουν επικυρώσει ότι ασθενείς με NAFLD εξελίσσονται συχνά σε NASH, προχωρώντας σε προηγμένη ίνωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) (Steth, 1997). Επίσης, τα πρόσφατα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι η NAFLD και η NASH συσχετίζονται, σε παγκόσμιο επίπεδο, εξίσου με την παχυσαρκία και το διαβήτη τύπου 2 (π.χ., στην Αφρική, την Ασία, την Αυστραλία, την Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή, τη Βόρειο Αμερική και τη Λατινική Αμερική - Πίνακας 1). Οι επιδημιολογικές μελέτες ενισχύουν τη μονόδρομη σχέση μεταξύ NAFLD και MetS, η οποία φαίνεται ότι μπορεί

να είναι αιτιολογικός παράγοντας που ενεργοποιεί τον παθοφυσιολογικό καταρράκτη της NAFLD.

Πίνακας 1. Επιπολασμός NAFLD ανά τον κόσμο (Sherif et al., 2016)

Εθνικότητα	NAFLD	NASH	Παιδιά/NAFLD
Παγκόσμια	4%-46%	3%-5%	n.r
Δύση	20%-40%	2%-3%	n.r
Ανατολή	10%-20%	n.r	n.r
Αφρική	n.r	n.r	n.r
Ελλάδα	31%	40%	n.r
ΗΠΑ	27%-34%	3%-5%	10%-20%
Ευρώπη	25%	n.r	n.r
Κίνα	15%-30%	n.r	4%-5,2%

n.r: Δεν υπάρχουν στοιχεία

1.1.3 Διάγνωση

Η NAFLD, συνήθως ιστολογικά, κατηγοριοποιείται στην καλοήγη μορφή, που είναι απλή στεάτωση, και στην προοδευτική μορφή, τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH). Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με NAFLD αναπτύσσει τη νόσο σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά της αντίστασης στην ινσουλίνη (IR) και του μεταβολικού συνδρόμου (Mets). Το μεταβολικό σύνδρομο περιλαμβάνει ένα σύμπλεγμα κλινικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, δηλαδή IR, δυσανεξία στη γλυκόζη ή διαβήτη, παχυσαρκία, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία και καρδιαγγειακή θνητότητα (Balkau & Charles, 1999). Ειδικά, η NASH θεωρείται ότι συνδέεται με εξέλιξη σε κίρρωση του ήπατος, με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) (Bugianesi et al., 2002), καθώς και με αυξημένη θνησιμότητα.

Η διάγνωση της NAFLD (Chalasani et al., 2012) βασίζεται στην ιστολογική ή απεικονιστική απόδειξη της ηπατικής στεάτωσης, την απουσία σημαντικής κατανάλωσης αλκοόλ, την ηπατική νόσο άλλων αιτιών (π.χ., ιογενή ηπατίτιδα, νόσος του Wilson), καθώς, επίσης, και την απουσία αιτιών όπως έκθεση σε τοξίνες/φάρμακα, παρεντερική διατροφή κ.λπ. Η διάγνωση της NASH απαιτεί βιοψία ήπατος, που δείχνει ηπατική στεάτωση με νεκρο-φλεγμονώδη δραστηριότητα και διόγκωση ηπατοκυττάρων με ή χωρίς ίνωση. Ο επιπολασμός της NASH είναι χαμηλότερος από εκείνον της NAFLD και κυμαίνεται από 3% έως 5% (Vernon et al., 2011) του συνολικού πληθυσμού.

Σχήμα 1. Διαγνωστικά κριτήρια για το Mets (Alberti et al., 2009)

¹: >94 cm για τους άνδρες, >80 cm για τις γυναίκες

²: >150mg/dl ή υπολιπιδαιμική θεραπεία

³: <40mg/dl για τους άνδρες, <50mg/dl για τις γυναίκες ή υπολιπιδαιμική θεραπεία

⁴: >130/85 mm Hg ή αντιυπερτασική θεραπεία

⁵: >100mg/dl ή αντιδιαβητική θεραπεία

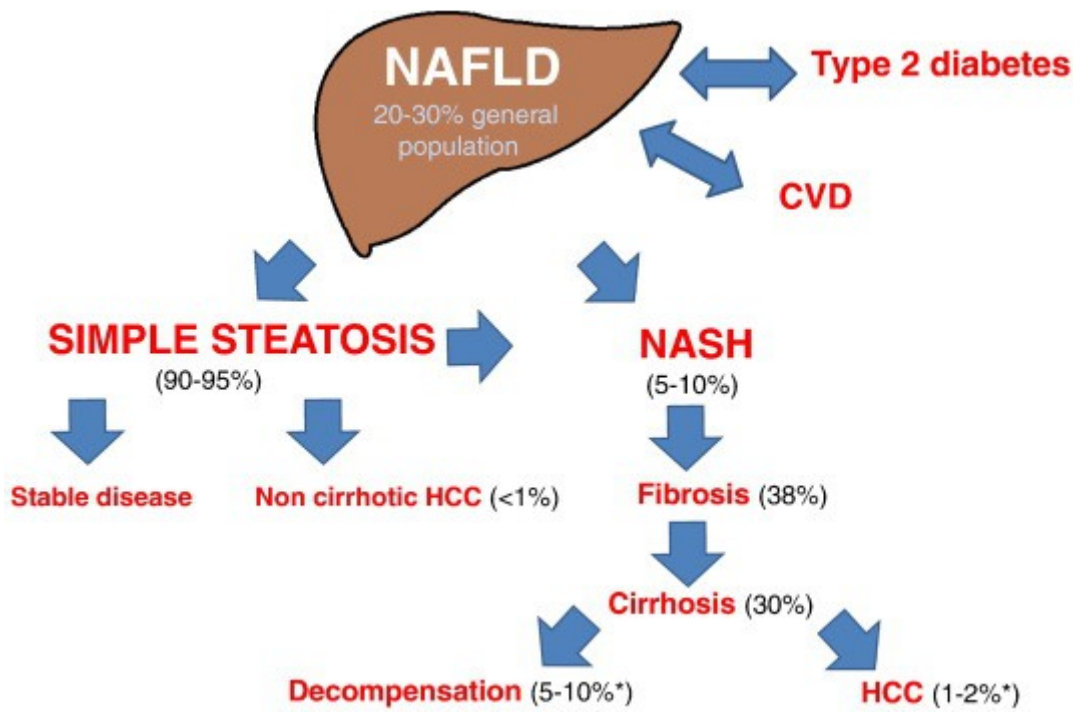
1.1.4 Παράγοντες εξέλιξης μη αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας

Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την εξέλιξη της NAFLD είναι ακόμα ελάχιστα κατανοητοί. Η συσσώρευση ηπατοκυτταρικού λίπους είναι πολυπαραγοντικής προέλευσης και μπορεί να οφείλεται σε μεταβολικούς (Bugianesi et al., 2005), ιογενείς (Hofer et al., 2002), τοξικούς (Grieco et al., 2005) και γενετικούς παράγοντες (Stättermayer et al., 2015; Romeo et al., 2008).

Μεταξύ των παραγόντων NAFLD καλύτερα έχει διερευνηθεί το μεταβολικό σύνδρομο (Mets) (Machado et al., 2006; Assy et al., 2000; Leite et al., 2009; Wong et al., 2015), η παχυσαρκία, ο διαβήτης και οι μεταλλάξεις του PNPLA3. Σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με NAFLD θεωρείται ότι πρόκειται για ηπατική εκδήλωση του Mets, αν και υπάρχει, επίσης, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών χωρίς Mets.

Δεδομένου ότι υπάρχουν αρκετοί ασθενείς χωρίς μεταβολικό σύνδρομο ή/και γενετικό προφίλ κινδύνου, υπάρχει ανάγκη να διερευνηθούν περαιτέρω παράγοντες που συμμετέχουν στην παθογένεση της NAFLD/NASH.

Επιπλέον, η NAFLD, αν και εμφανίζεται σε όλες τις εθνοτικές ομάδες, φαίνεται να έχει χαμηλότερο επιπολασμό ανάμεσα στους Αφροαμερικανούς, σε σύγκριση με τους Ισπανοαμερικανούς και τους Ευρωπαίους. Η διαφορά αυτή παραμένει ακόμα και μετά τη διόρθωση για την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη (IR) (Browning et al., 2004; Everhart, 2003), ενώ μπορεί να σχετίζεται με φυλετικές διαφορές στην ομοιόσταση των λιπιδίων.



Σχήμα 2. Προοδευτική μετάπτωση από NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) σε NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis) με ή χωρίς ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Buzzetti et al., 2016)

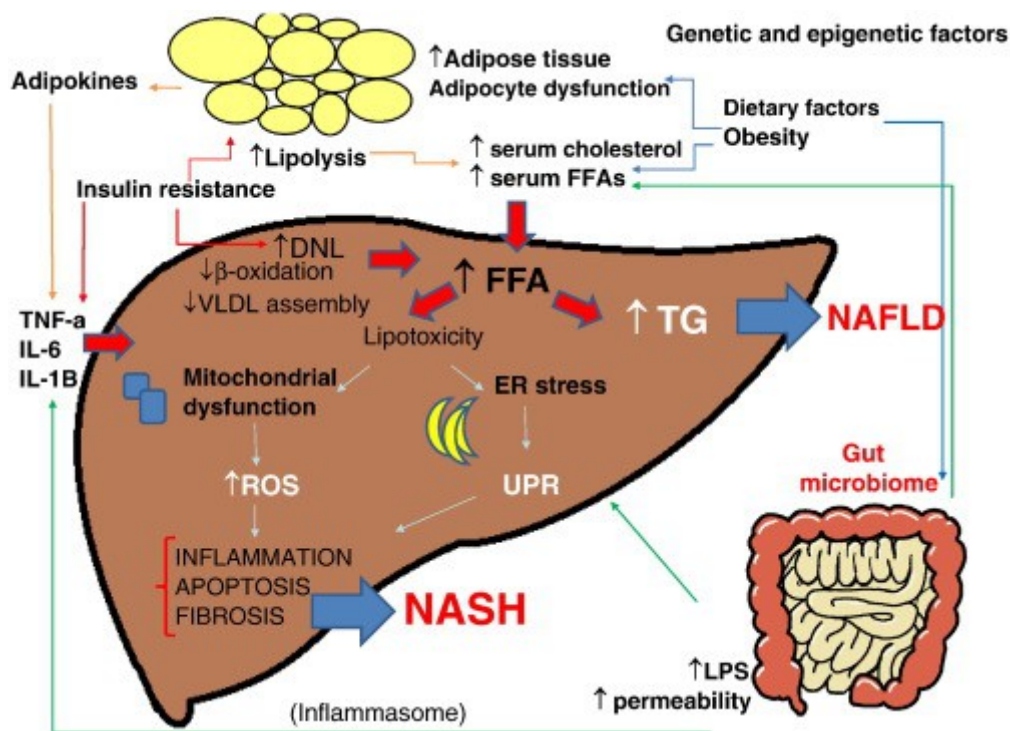
1.2 Παθογένεση NAFLD

1.2.1 Υπόθεση 2 χτυπημάτων - πολλαπλών χτυπημάτων

Σε ό,τι αφορά τις αρχικές υποθέσεις για τη NAFLD, αναφέρεται η υπόθεση των 2 χτυπημάτων. Βάσει της συγκεκριμένης θεωρίας, το πρώτο χτύπημα αντανακλά τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων και ελευθέρων λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα και τη δημιουργία ηπατικής στεάτωσης, με κύριο παθογενετικό μηχανισμό την αντίσταση στην ινσουλίνη και, δευτερευόντως, την αυξημένη ηπατική λιπογένεση και ενισχυμένη εισροή λιπιδίων από τη διατροφή. Το λιπώδες πλέον ήπαρ γίνεται πιο ευάλωτο στο δεύτερο χτύπημα, τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες/αδιποκίνες, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες, που οδηγεί σε ηπατοκυτταρική βλάβη, φλεγμονή και ίνωση.

Τελευταία υπάρχει αυξανόμενη αναγνώριση του ρόλου που παίζουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και στην άμεση προώθηση της ηπατικής βλάβης, η οποία έχει οδηγήσει σε τροποποίηση αυτής της θεωρίας. Στην παχυσαρκία, αλλά και κατά την αντίσταση στην ινσουλίνη, υπάρχει αυξημένη εισροή ελευθέρων λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Τα FFA είτε υποβάλλονται σε β-οξείδωση είτε εστεροποιούνται με γλυκερίνη για να σχηματίσουν τα τριγλυκερίδια, που οδηγούν σε συσσώρευση ηπατικού λίπους. Υπάρχουν πλέον σημαντικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα FFA μπορεί να προκαλέσουν άμεσα τοξικότητα, αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες και ενεργοποιώντας φλεγμονώδη μονοπάτια (Feldstein et al., 2004). Επομένως, η ηπατική συσσώρευση τριγλυκεριδίων μπορεί να είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός που εμποδίζει τα τοξικά αποτελέσματα των μη εστεροποιημένων FFA (Yamaguchi et al., 2007).

Επιπλέον, υπάρχει η θεωρία των πολλαπλών χτυπημάτων στην οποία επιπροσθέτως περιλαμβάνονται παράγοντες, όπως οι διατροφικές συνήθειες, οι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες, η παχυσαρκία με τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων, καθώς και αλλαγές στο εντερικό μικροβίωμα (Buzzeti et al., 2016) (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Η υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων στην ανάπτυξη NAFLD (Buzzetti et al., 2016)

1.2.2 Συσσώρευση λιπιδίων/στεάτωση

Όσον αφορά τη NAFLD, η συσσώρευση τριγλυκεριδίων, που δημιουργούνται έπειτα από εστεροποίηση των FFA και της γλυκερόλης στο ηπατοκύτταρο, είναι το κύριο χαρακτηριστικό της. Η δημιουργία FFA προκύπτει στο ήπαρ από τρεις διαφορετικές πηγές, τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό, τις διαιτητικές πηγές και την *de novo* λιπογένεση (DNL) (Postic & Girard, 2008).

Από τη άλλη πλευρά, τα FFA χρησιμοποιούνται είτε μέσω της β-οξείδωσης είτε μέσω της επανεστεροποίησης σε τριγλυκερίδια, τα οποία μπορούν να αποθηκευτούν σαν σταγόνες λιπιδίων ή ακόμα και πακεταρισμένα και εξαγόμενα σαν χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες. Το ηπατικό λίπος μπορεί να αποθηκευτεί έπειτα από αυξημένη σύνθεση λίπους, αυξημένη απελευθέρωση ή ακόμα και μικρή εξαγωγή (Postic & Girard, 2008).

Προκειμένου να καθορισθεί η συμβολή που έχουν τα λιπίδια στην παραπάνω συσσώρευση σε άτομα τα οποία έχουν NAFLD, οι Donnelly et al. εργάστηκαν σε μια μέθοδο με πολλαπλά σταθερά ισότοπα. Έτσι, ανέφεραν ότι το 60% των τριγλυκεριδίων του ήπατος προέρχεται από τη FFA εισροή από το λιπώδη ιστό, το 26% από DNL και το 15% από δίαιτα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μελέτης στην οποία αναφέρεται ότι υγιή άτομα έχουν DNL και η οποία συμβάλλει λιγότερο από 5% σε ηπατικά τριγλυκερίδια.

Τριγλυκερίδια μπορεί, επίσης, να εξαχθούν από το ήπαρ σε σωματίδια VLDL, τα οποία σχηματίζονται από την ενσωμάτωση τριγλυκεριδίων σε απολιποπρωτεΐνη Β (apoB) μαζί με μικροσωματική πρωτεΐνη μεταφοράς (MTP) (Adams et al., 2005). Οι μεταβολές στη σύνθεση και έκκριση MTP/apoB έχουν προταθεί ως πιθανοί μηχανισμοί που στηρίζουν την παθογένεια της NAFLD που προκαλεί μείωση της ικανότητας εξαγωγής λιπιδίων (Charlton et al., 2002; Namikawa et al., 2004).

1.2.3 Αντίσταση στην ινσουλίνη

Η ινσουλίνη έχει ισχυρή δράση στην καταστολή της λιπόλυσης του λιπώδους ιστού. Ωστόσο, σε καταστάσεις IR, όπως η NAFLD, αυτή η καταστολή είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα την αυξημένη εκροή των ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό (Avabe et al., 2000). Η υπερινσουλιναιμία που σχετίζεται με IR οδηγεί σε:

- (I) Υπερ-ρύθμιση του στερολικού ρυθμιστικού παράγοντα μεταγραφής δεσμευμένης πρωτεΐνης-1c (SREBP-1c), ο οποίος είναι ένας ρυθμιστής κλειδί της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στη DNL (Stefan et al., 2008) και
- (II) αναστολή της β-οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων, προάγοντας έτσι την περαιτέρω ηπατική συσσώρευση λιπιδίων (Postic & Girard, 2008).

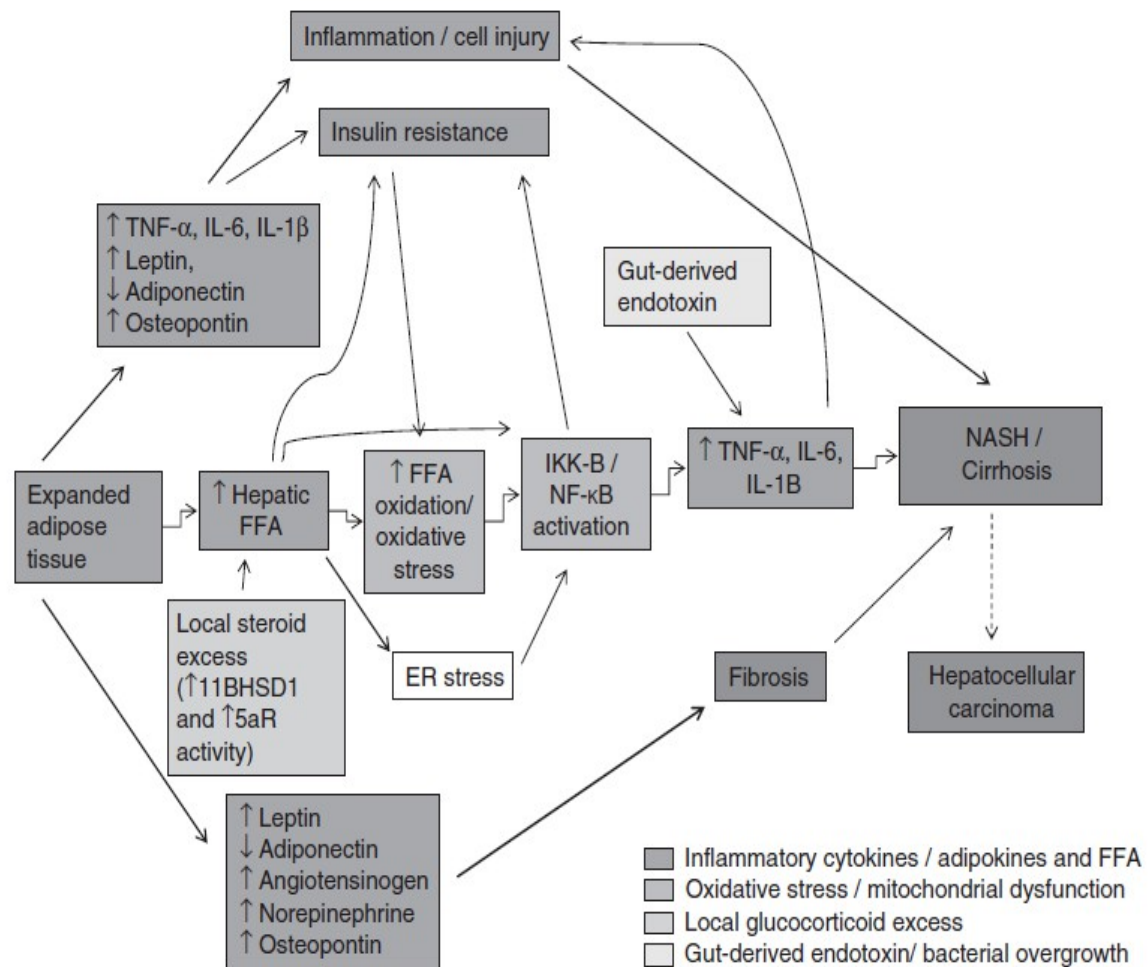
Πολλές από τις ανωμαλίες που αναφέρθηκαν στη NAFLD παρεμβαίνουν στον καταρράκτη σηματοδότησης ινσουλίνης, συμβάλλοντας έτσι στην IR. Αυτές περιλαμβάνουν τα FFA, τον παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-α), τον πυρηνικό παράγοντα κάππα Β (NF-kB), το ceramide, την jun N-terminal kinase 1 (JNK1), τους SOCS (καταστολείς σηματοδότησης των κυτοκινών) και το κυτόχρωμα CYP2E1 (Taniguchi et al., 2006; McCullough, 2006). Αυξημένοι μεταβολίτες λιπιδίων, όπως η διακυλογλυκερόλη (DAG), έχουν εμπλακεί στον εξαρτώμενο μηχανισμό της Ce πρωτεϊνικής κινάσης (PKCe), που παρεμβαίνει στη σηματοδότηση ινσουλίνης μέσω αναστολής της ινσουλίνης. Παρόμοιες διαδικασίες συμβαίνουν σε σκελετικά μυικά κύτταρα, οδηγώντας σε μια πιο γενικευμένη κατάσταση IR.

1.2.4 Φλεγμονή/στεατοηπατίτιδα

Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και FFA

Η παρουσία στεάτωσης σχετίζεται με τη χρόνια ηπατική φλεγμονή (Cai et al., 2005). Συγκεκριμένα, σε μοντέλα ποντικών με διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (HFD) η επαγόμενη στεάτωση συνδέεται με αυξημένη δραστηριότητα NP-κΒ, που συνδέεται με αυξημένη ηπατική έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως TNF-α, ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ιντερλευκίνη-1 βήτα (IL-1β), καθώς και ενεργοποίηση των Kupffer cells (Choi et al., 2007). Η μετατροπή των FFA σε ηπατικά τριγλυκερίδια είναι χρήσιμη σαν προστατευτικό μέτρο, ώστε να προληφθεί η ηπατική λιποτοξικότητα. Στο μοντέλο ποντικών με NAFLD επικυρώθηκε η θεωρία αυτή, όπου η αναστολή του ενζύμου DGAT2 κατέληξε σε σύνθεση τριγλυκεριδίων και, τέλος, σε αύξηση της ηπατικής στεάτωσης, σε IR, αλλά και σε επιδείνωση της ίνωσης (Yamauchi et al., 2007; Choi et al., 2007).

Η παραγωγή ηπατοκυττάρων κυτοκίνης, που έχει βασικό ρόλο στην προώθηση της στεάτωσης σε NASH, έχει υποστηριχθεί από πολλές μελέτες και το συμπέρασμα δείχνει ότι οι κυτοκίνες είναι σε θέση να αναπαράγουν τα ιστολογικά στοιχεία σχετικά με τη NASH, όπως αυτά της χημειοταξίας των ουδετερόφιλων, της απόπτωσης ηπατοκυττάρων, της δημιουργίας σωμάτων Mallory, αλλά και της ενεργοποίησης αστεροειδών κυττάρων (Day, 1998). Μέσα από αυτά τα στοιχεία φαίνεται ότι η φλεγμονή είναι σε θέση να προωθήσει την καρκινογένεση (Pikarsky et al., 2004). Επιπλέον, η χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση, η οποία σχετίζεται με την ηπατική στεάτωση, μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αδιποκινών HCC (Day, 1998).



Σχήμα 4. Προτεινόμενη παθογένεια της NASH. Η πιθανότητα εξέλιξης σε προχωρημένη NASH/κίρρωση. Αποτελέσματα από μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικής προδιάθεσης και άλλων μηχανισμών

Αδιποκίνες

Σε ό,τι αφορά το λιπώδη ιστό, αυτός δεν είναι απλά ένας χώρος αδρανής ο οποίος αποθηκεύει ενέργεια, αλλά ένας χώρος ενεργός και ένα σημαντικό ενδοκρινές όργανο. Ολοένα και περισσότερο έχει αναγνωρισθεί ο ρόλος των αδιποκινών λεπτίνης και αδιπονεκτίνης που εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα. Η λεπτίνη δεν είναι παρά μια λεπτή ορμόνη με μέγεθος 16Da και η παραγωγή της γίνεται από ώριμα λιποκύτταρα με δράση κυρίως ρύθμισης, πρόσληψης και δαπάνης ενέργειας. Σημαντικά επίπεδα αυτής έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με παχυσαρκία και σε άτομα με NAFLD (Mantzoros, 1999).

Σε αντίθεση με τη λεπτίνη, τα επίπεδα έκκρισης και κυκλοφορίας της αδιπονεκτίνης είναι αντιστρόφως ανάλογα με την περιεκτικότητα του σώματος σε λίπος (Whitehead et al., 2006) και μειώνονται σε ασθενείς με NAFLD (Hui et al., 2004). Η αδιπονεκτίνη είναι αντιφλεγμονώδης

και αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Berg et al., 2002), ενώ βελτιώνει την ηπατομεγαλία και τις βιοχημικές, ιστολογικές παραμέτρους της NAFLD σε μοντέλα ποντικών (Xu et al., 2003; Tomita et al., 2008). Η αδιπονεκτίνη ανταγωνίζεται τα αποτελέσματα του παράγοντα TNF-α, ο οποίος καταστέλλει την παραγωγή της (Ehitehead et al., 2006).

Η σημασία της αδιπονεκτίνης στη NAFLD υποστηρίζεται από μελέτες που δείχνουν ότι τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού μπορεί να βοηθήσουν να γίνει διάκριση της NASH από απλή στεατώση (Kaser et al., 2005; Lemoine et al., 2009). Άλλοι παράγοντες του λιπώδους ιστού που βρίσκονται σε περίσσεια στη NAFLD περιλαμβάνουν TNF-α, IL-6, αγγειοτενσινογόνο και ρεζιστίνη, τα οποία ανταγωνίζονται τις λιπογόνες επιδράσεις της ινσουλίνης (Lou et al., 55), αλλά ο ακριβής ρόλος τους στην παθογένεση της NAFLD μένει να καθοριστεί.

Οξειδωτικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στη NASH είναι καλά εδραιωμένος και μάλιστα το στάδιο της νόσου συσχετίζεται με το βαθμό του οξειδωτικού στρες (Seki et al., 2002; Sanyal et al., 2001). Η β-οξείδωση στο φυσιολογικό ήπαρ λαμβάνει χώρα μέσα στα μιτοχόνδρια, αλλά στο πλαίσιο της NAFLD (Petta et al., 2009) αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι κυρίαρχη, ως αποτέλεσμα των αυξημένων FFA, δίνοντας το έναυσμα για δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).

Οι ROS επάγουν οξειδωτικό στρες με επακόλουθη ενεργοποίηση φλεγμονωδών μονοπατιών και επίσης μιτοχονδριακή βλάβη. Δομικές μιτοχονδριακές ανωμαλίες (Sanyal et al., 2001) και μείωση στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες NASH σε ανθρώπους (Perez et al., 2003). Αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα του οξειδωτικού ενζύμου ηπατικού μικροσωματικού λιπαρού οξέος του κυτοχρώματος P450 2E1 (CYP2E1) έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπινα και ζωικά μοντέλα NASH και αντιπροσωπεύει μια ισχυρή πηγή ROS (Weltman et al., 1996; Weltman et al., 1998). Σημαντική διαγνωστική υπερέκφραση CYP2E1 σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες, την IR και την ηπατική συγκέντρωση λίπους (Kathirvel et al., 2009).

Στρες ενδοπλασματικού δικτύου και βακτηριακή υπερανάπτυξη

Σε ό,τι αφορά την παθογένεση της NASH και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, έχει αναφερθεί ως πιθανός παράγοντας και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Αυτό το συγκεκριμένο είδος στρες μπορεί να δημιουργείται από κάποιους παράγοντες όπως η υπερινσουλιναμία, ενώ την ίδια στιγμή μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση άλλων οδών όπως

IR, φλεγμονή και απόπτωση ή/και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Είναι, επίσης, γνωστό ότι έχει σημαντικό ρόλο στην αλκοολική επαγόμενη στεατοηπατίτιδα (Day, 2007) και χρειάζεται περισσότερη μελέτη σε ό,τι αφορά τη δράση του στη NASH.

Πολλά είναι τα στοιχεία για τη λειτουργία και το ρόλο της βακτηριακής υπερανάπτυξης στην παθογένεση της NASH. Ως αποτέλεσμα αυτής, αναφέρεται η απελευθέρωση των βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών και η δημιουργία αιθανόλης (Day, 2007). Συγκεκριμένα, η βακτηριακή υπερανάπτυξη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αιθανόλης (Wigg et al., 2001) και την απελευθέρωση βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών, ενώ και τα δύο αυτά μπορεί να ενεργοποιήσουν την παραγωγή TNF-α, καθώς και κυττάρων Kupffer, και έτσι να προκληθεί ηπατική φλεγμονή (Solga & Dielhi, 2003). Μικρή εντερική βακτηριακή υπερανάπτυξη και αύξηση της διαπερατότητας του εντέρου έχουν βρεθεί πιο συχνά σε ασθενείς με NASH, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Wigg et al., 2001; Miele et al., 2009).

Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν, τόσο από εξωγενείς όσο και από ενδογενείς παράγοντες, τα αίτια της NAFLD. Όσοι ασθενείς πάσχουν από σύνδρομο Cushing έχουν αυξημένα επίπεδα GC και παρουσιάζουν φαινόμενα παχυσαρκίας, IR και διαβήτη. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα GCs προάγουν τη συσσώρευση ηπατικού λίπους περιλαμβάνουν την αναστολή β-οξειδωσης λιπαρών οξέων και την προώθηση των ηπατοκυττάρων μέσω DNL. Ωστόσο, οι περισσότεροι ασθενείς με NAFLD έχουν φυσιολογικά κυκλοφορούντα επίπεδα κορτιζόλης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ειδικοί μηχανισμοί για κάθε ιστό καθοδηγούν τη μεταβολική δυσλειτουργία (Tomlinson et al., 2008) και ως εκ τούτου αυξάνονται τοπικά τα επίπεδα CG. Αναστολή της 11bHSD1 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το σωματικό βάρος και τα επίπεδα των λιπιδίων και βελτιώνει την ανοχή στη γλυκόζη σε ζωικά μοντέλα (Hermanowski et al., 2005), ενώ αυξάνει την ηπατική ευαισθησία στην ινσουλίνη σε ανθρώπους (Andrews et al., 2003).

Παράλληλα, τα ένζυμα αναγωγής A-δακτυλίου 5-a και 5-b είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της κορτιζόλης σε ανενεργούς τετραϋδρομεταβολίτες. Αυξημένη ηπατική δραστηριότητα 5-a αναγωγής έχει αποδειχθεί σε ασθενείς με IR (Tomlinson et al., 2008) και NAFLD (Konopelska et al., 2009), το οποίο μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό για να μειώσει την τοπική διαθεσιμότητα GC, ώστε να προσπαθήσει να αποτρέψει την ανάπτυξη ή την πρόοδο της NAFLD.

1.2.5 Ίνωση

Η ίνωση καθώς και η πιο προχωρημένη μορφή της, η κίρρωση, αντιπροσωπεύουν το τελικό κοινό στοιχείο όλων σχεδόν των χρόνιων παθήσεων του ήπατος, συμπεριλαμβανομένης και της NASH. Προχωρημένη ίνωση οδηγεί σε ηπατική ανεπάρκεια και πυλαία υπέρταση με επιπλοκές του ασκίτη, σε απειλητική για τη ζωή κίρρωτική αιμορραγία, καθώς, επίσης, και σε αυξημένο κίνδυνο ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Υπάρχουν ορισμένες πτυχές της ηπατικής ίνωσης οι οποίες είναι, σχετικά, ειδικές για τη NASH. Στις περισσότερες συνθήκες, η επισκευή της ηπατικής βλάβης προκύπτει από την αντιγραφή του ώριμου ηπατοκύτταρου (Sell, 2001). Ωστόσο, η παρουσία των εν εξελίξει ζημιογόνων παραγόντων, όπως η NASH ή μία ιογενής λοίμωξη, σχετίζονται με υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, το οποίο μειώνει την ικανότητα αυτών των ώριμων ηπατοκυττάρων να πληθύνουν. Σε αυτήν την κατάσταση άλλες οδοί αναγέννησης του ήπατος, όπως ηπατικά προγονικά κύτταρα (HPCs), ενεργοποιούνται.

Τα HPCs είναι κύτταρα ενίσχυσης-διακίνησης που εδρεύουν στο Κανάλι του Hering και τα οποία, μέσω πολλαπλασιασμού τους, σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα μικρών αγωγών και χοληφόρων, γνωστό ως αντίδραση σωληνίσκων. Αυτός ο όρος χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει τον διευρυμένο πληθυσμό επιθηλιακών κύτταρων στη διεπιφάνεια του χοληφόρου δένδρου και των ηπατοκυττάρων και αναφέρεται στον πολλαπλασιασμό των προϋπαρχόντων αγωγών, την ενεργοποίηση προγονικών κυττάρων και την εμφάνιση ενδιάμεσων ηπατοκυττάρων (Roskams et al., 2004). Στη συνέχεια, αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε αμφοτέρω χοληφόρα και ηπατοκύτταρα, συμβάλλοντας στην αποκατάσταση του ήπατος. Ωστόσο, όπως φαίνεται, υπάρχει αδυναμία να εξαπολύσουν τέτοια απόκριση σωληνίσκων ασθενείς που μεταμοσχεύονται για NASH και έχουν απονευρωμένο ήπαρ. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να έχουμε μια πιο προοδευτική μορφή ηπατικής βλάβης.

Διαμάχη, εντούτοις, συνεχίζει να υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με την αλληλεπίδραση των σωληνίσκων αντίδρασης και της ίνωσης στη NAFLD. Αρχική εργασία απεδείκνυε μια στενή σχέση ανάμεσα στην επέκταση των HPCs και την αντίδραση σωληνίσκων, σε δείγματα βιοψίας ήπατος με NASH. Η έκταση των σωληνίσκων αντιδράσεως συσχετίζεται με τη σειρά της έντονα με το βαθμό της ίνωσης, υποδηλώνοντας ότι η επέκταση της αλληλεπίδρασης HPCs/σωληνίσκων μπορεί να είναι υπεύθυνη για την προοδευτική περιπυλαία ίνωση (Richardson et al., 2007). Πιθανοί μηχανισμοί για αυτό περιλαμβάνουν την έκκριση κυτοκινών

(TGF- β , IL6, IL8 και MCP1) με την αντίδραση σωληνίσκων (Svegliati et al., 2008), καθώς και άμεση μετάβαση από επιθηλιακά μεσεγχυματικά κύτταρα από τα χοληφόρα σε μυοϊνοβλάστες (Xia & Michalopoulos, 2006). Αυτή η υπόθεση είναι ελκυστική διότι παρέχει μια λογική για την παραγωγή της εισαγωγικής ίνωσης στη NAFLD, που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της εξέλιξης της νόσου. Πιο πρόσφατες εργασίες σε μοντέλα ποντικών με NAFLD έχουν προτείνει ότι η ηπατική ίνωση προηγείται του πολλαπλασιασμού των HPCs, υποδηλώνοντας ότι ίνωση δεν συμβαίνει αποκλειστικά ως αποτέλεσμα της αύξησης HPCs (Van Hul et al., 2009).

Η χρονική στιγμή της παρουσίας των διαφορετικών ιστολογικών ευρημάτων είναι λιγότερο σαφής όσον αφορά την περαιτέρω αξιολόγηση, αυξάνοντας την πιθανότητα μιας εντελώς πιο περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ ίνωσης και επέκτασης HPCs, στην οποία και οι δύο κυτταρικές διεργασίες μπορεί να επιδρούν η μια στην άλλη.

1.3 Γενετική προδιάθεση στη NAFLD

1.3.1 Γονίδια - πολυμορφισμοί που επηρεάζουν τη νόσο

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις από πληθυσμιακές μελέτες, καθώς και από μελέτες διδύμων, που παρείχαν γνώση σχετικά με τη NAFLD. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία, οι εκτιμήσεις κληρονομικότητας κυμαίνονται από 20% έως 70%, ανάλογα με το σχεδιασμό της μελέτης, την εθνικότητα και τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, συμπεριλαμβανομένης της τεχνολογίας απεικόνισης για το χαρακτηρισμό του φαινοτύπου.

Ενώ μερικές τεχνολογίες απεικόνισης που χρησιμοποιούνται είναι εξαιρετικά προσιτές και εύκολες να εφαρμοστούν στην κλινική πράξη, υπάρχουν άλλες που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες και ειδικές, αλλά πολύ ακριβές. Μεταξύ αυτών κυρίως το υπερηχογράφημα ήπατος (US), η κοιλιακή υπολογιστική τομογραφία (CT) και η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (MRS) χρησιμοποιούνται για την ποιοτική ή ποσοτική μέτρηση της διήθησης λίπους στο ήπαρ. Οι πιο πρόσφατες αναφορές, που βασίζονται σε μεγάλους πληθυσμούς, έχουν δώσει ακριβέστερες εκτιμήσεις για το μέγεθος της κληρονομικότητας της NAFLD. Για παράδειγμα, οι Speliotes et al. (Speliotes et al., 2011) ανέφεραν εκτιμήσεις για την κληρονομικότητα της ηπατικής στεάτωσης μεταξύ 26%-27% σε ένα μεγάλο δείγμα ευρωπαϊκού πληθυσμού [n=6.629]. Αν και η ηπατική στεάτωση είναι συχνή σε ασθενείς με παχυσαρκία και IR, προοδευτικά μια μειοψηφία προχωρά σε NASH και κίρρωση, γεγονός που υποδηλώνει μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικής προδιάθεσης και περιβαλλοντικών παραγόντων (Petta et al., 2009). Επίσης, οι πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων, η IR, το οξειδωτικό

στρες, οι κυτοκίνες/αντιποκίνες και η ινωδογενέση μπορούν όλοι να αυξήσουν την ευαισθησία σε ανάπτυξη NASH (Wilfred de Alwis, 2007). Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων (SNPs) που επηρεάζουν την ανάπτυξη ίνωσης σε άλλες ασθένειες του ήπατος, ιδιαίτερα στη χρόνια ηπατίτιδα C (Sermasathanasawadi et al., 2008; Okamoto et al., 2005; Guo et al., 2009).

Μελέτες σε ασθενείς με NASH έχουν μέχρι στιγμής αποδείξει πολυμορφισμούς στο αγγειοτενσινογόνο και TGF- β 1 γονίδιο που συνδέονται με προχωρημένη ηπατική ίνωση σε παχύσαρκους ασθενείς (Dixon et al., 2003). Επιπλέον, SNPs στην αγγειοτενσίνη II υποδοχέα τύπου 1 συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο NAFLD που σχετίζεται με ίνωση (Yoneda et al., 2009). Επίσης, το SNP rs738409 στο γονίδιο PNPLA3 έχει συσχετισθεί με τη νόσο σε όλα τα γενετικά μοντέλα, ανεξαρτήτως ηλικίας και εθνότητας (Sci rep, 2015). Συγκεκριμένα, η υποκατάσταση μεθειονίνης με ισολευκίνη στη θέση 148 του rs738409 στο γονίδιο PNPLA3 συνδέεται στενά με αυξημένη περιεκτικότητα του ήπατος σε λιπαρά (Romeo et al., 2008; Yuan et al., 2008) με ή χωρίς NASH (Sookoian et al., 2009), που οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για ηπατική ίνωση (Valenti et al., 2010) και HCC (Liu et al., 2014). Η μετάλλαξη rs58542926 E167K στο διαμεμβρανικό μέλος 6 της υπερικογένειας 2 (TM6SF2) προωθεί ανωμαλίες στη στεάτωση και τα λιπίδια, μεταβάλλοντας την έκφραση TM6SF2 και MTTP, ενώ συνδέεται επίσης με φλεγμονή και ίνωση (Kozlitina et al., 2014).

Συνοπτικά, τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τον γενετικό κίνδυνο για NAFLD υποδηλώνουν την παρουσία τουλάχιστον τριών γενετικών παραγόντων σε τρεις διαφορετικούς τόπους (PNPLA3, TM6SF2 και GCKR), που σχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου, καθώς και την πρόοδο. Παρόλα αυτά, οι παραλλαγές που σχετίζονται με το NAFLD έχουν αρκετά διαφορετική επίδραση στην ευαισθησία του NAFLD από ενδιάμεση (~OR 3,4) ως χαμηλή (OR 1,2). Αυτό με τη σειρά του έχει ως αποτέλεσμα μια αρκετά διαφορετική συχνότητα για το αλληλόμορφο κινδύνου (MAF) από ~30% για rs738409 έως 7% για rs58542927.

Αν και η εκ των προτέρων χρήση των γενετικών εξετάσεων φαίνεται να είναι ενθαρρυντική, η συνολική εμπειρία υποδηλώνει ότι η αξία της χρήσης των SNPs για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας στη διάγνωση της NASH εξακολουθεί να είναι ασαφής. Μερικοί συγγραφείς μελετών υποστηρίζουν την εισαγωγή του rs738409 σε διαγνωστικές εξετάσεις, ενώ άλλοι δεν υποστηρίζουν τη χρήση του. Για παράδειγμα, οι Kotronen et al. (Kotronen et al., 2009) αξιολόγησαν την απόδοση της πρόβλεψης για NAFLD συνδυάζοντας τα συνήθη κλινικά

και εργαστηριακά δεδομένα και το γονότυπο rs738409 και παρατήρησαν μια ευαισθησία της τάξης του 86% και εξειδίκευση 71% για την εκτίμηση αυξημένης περιεκτικότητας του ήπατος σε λιπαρά.

Συλλογικά, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ιδέα των κοινών παραλλαγών (Manolio et al., 2009) στην παθογένεση της NAFLD, οι οποίες σήμερα θεωρούνται ως οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στον κίνδυνο της νόσου. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σχετικά με το ρόλο των σπάνιων παραλλαγών, καθώς και την αλληλεπίδραση γονιδίου-γονιδίου και αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος στη βιολογία της νόσου, οι οποίες πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω, καθώς πιθανόν συμβάλλουν στην κληρονομικότητα της νόσου.

Σχετικά με τη στεάτωση, μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί δύο επιπλέον νέες γενετικές ενώσεις, η μια στο γονίδιο NCAN με πολυμορφισμό rs2228603 και η άλλη στο γονίδιο PPP1R3B με πολυμορφισμό rs4240624. Αυτοί οι πολυμορφισμοί συσχετίστηκαν, επίσης, με αλλοιωμένο προφίλ λιπιδίων ορού (Speliotes et al., 2011). Επιπλέον, η παιδιατρική NAFLD σχετίζεται με διαφορετικό ιστολογικό φαινότυπο και μπορεί να είναι ταχέως προοδευτική (Brunst et al., 2009; Feldstein et al., 2009), προτείνοντας ότι η παιδική και η εφηβική NAFLD μπορεί να έχει διαφορετικό χαρακτήρα και παθογόνους παράγοντες ή μπορεί να ανταποκριθεί διαφορετικά στους μεταβολικούς παράγοντες κινδύνου σε σύγκριση με τους ενήλικες. Δυο πολυμορφισμοί, rs222054 και rs7324845, βρέθηκαν στα γονίδια GC και LCP1 (Adams et al., 2013), αντίστοιχα, που συνδέονται με NAFLD (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Κατάλογος SNPs που εμπλέκονται σε NAFLD (Adams et al., 2013)

SNP	Χρωμόσωμα	Γονίδιο	Major/Minor Αλληλίο	MAF	Λόγος πιθανοτήτων	Τυπική απόκλιση	P
rs12743824	1	LPPR4	A/C	0.441	2.30	1.20	4.82*10 ⁻⁶
rs222054	4	GC	G/C	0.301	2.54	1.21	1.20*10 ⁻⁶
rs7324845	13	LCP1	G/A	0.096	3.29	1.29	2.96*10 ⁻⁶
rs11864146	16	SLC38A8	G/A	0.100	3.14	1.27	1.86*10 ⁻⁶

MAF: Minor allele frequency

LPPR4: Πρωτεΐνη φωσφατάσης λιπιδίου τύπου 4

GC: Genome-specific component

LCP1: Λεμφοκυτταρική κυτοσολική πρωτεΐνη 1

SLC38A8: Η οικογένεια φορέων διαμόρφωσης 38 μέλος 8

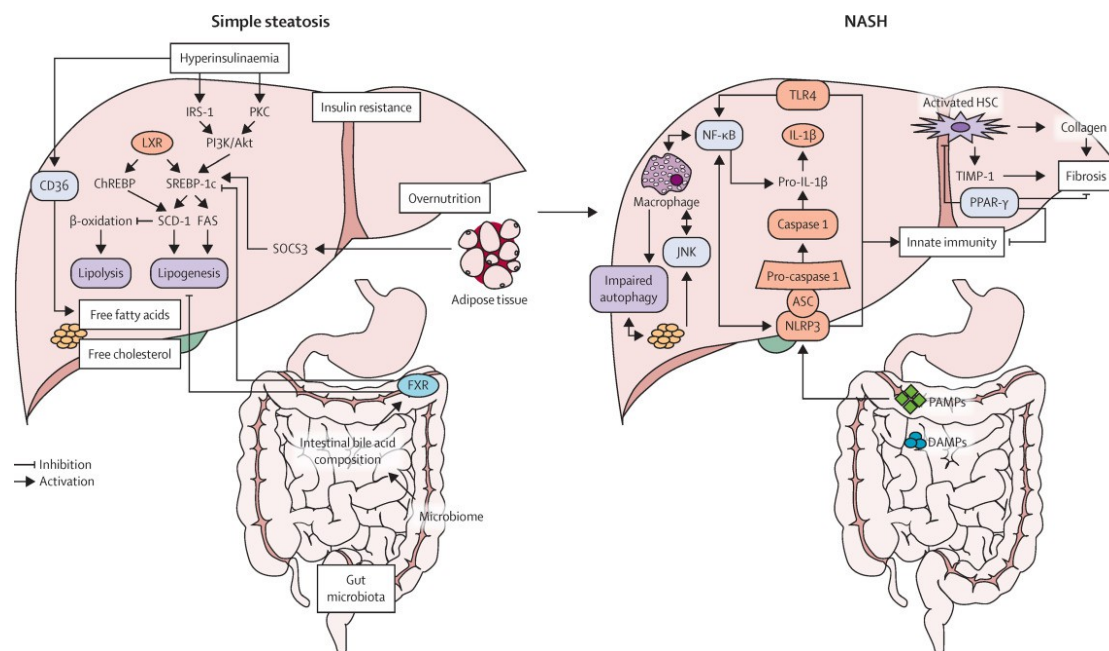
Λίγοι πολυμορφισμοί έχουν συνδεθεί με τη NAFLD σε παιδιατρικούς πληθυσμούς, συγκεκριμένα το γονίδιο PNPLA3 με τον πολυμορφισμό rs738409, το γονίδιο GCKR με τον πολυμορφισμό rs1260326 και το γονίδιο TM6SF2 με τον πολυμορφισμό rs58542926 (Umano et al, 2017), που σχετίζεται με έκκριση VLDL (Kozlitina et al, 2014), όπως, επίσης, και ο πολυμορφισμός του γονιδίου CDN10 rs4143093 (Al Serri, 2011). Τα παρακάτω γονίδια και οι πολυμορφισμοί (Πίνακας 3) έχουν βρεθεί από τη βιβλιογραφία (Umano et al, 2017) ότι εμπλέκονται στη NAFLD, ενώ μαζί περιγράφεται και η συσχέτιση με τη νόσο.

Πίνακας 3. Κατάλογος γονιδίων που εμπλέκονται με NAFLD (Umano et al., 2017)

Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Συσχέτιση
FDFT1	rs2645424	Μπορεί να επηρεάσει την πρόοδο μέσω ίνωσης
MBOAT7	rs626283 και rs641738	Δύο πολυμορφισμοί που συνδέονται με τη σοβαρότητα της ίνωσης
PNPLA3	rs738409	Πολυμορφισμός που συνδέεται με αυξημένη προ απόπτωση γονιδιακής έκφρασης, NASH και ίνωση
GCKR	rs1260326	Ο πολυμορφισμός έχει ανεξάρτητη συσχέτιση με τη NAFLD. Βιοψίες απέδειξαν NASH και ίνωση
TM6SF2	rs58542926	Ο πολυμορφισμός συνδέεται με NAFLD, NASH και ίνωση
NNPP1/PC-1	Lys121Gln	Ίνωση
IRS-1	Gly972Arg	Ίνωση
ADIPOQ	45G>T, 276G>T και 11377C>G	Συνδέονται με χαμηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα, σοβαρότητα στεάτωσης, NASH και ίνωση
SAMM50	Πολυμορφισμοί	Έκθεση ηπατικών κυττάρων σε υψηλότερο οξειδωτικό στρες
MTHFR	C677T και A1298C	NASH
MTTP	-493C/T, E98D, I128T, N166S	Συνδέονται με αυξημένα επίπεδα μεταγευματικής λιπογένεσης, που ενισχύει το οξειδωτικό στρες, οδηγώντας σε ενεργοποίηση αστεροειδών κυττάρων και κυττάρων Kupffer και έπειτα σε φλεγμονή
TNF-α	-1301C και -863A	Πολυμορφισμοί προώθησης, συχνοί σε NASH
IL 1-β	rs16944 και rs1143634	Εμφανίζονται σε ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη NASH
IL-6	rs1049956	Εμφανίζεται σε ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη NASH

NAFLD: Μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ

NASH: Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα



Σχήμα 5. Μηχανισμός μετάπτωσης από απλή στεάτωση σε NASH - εμπλοκή γονιδίων στο ήπαρ

1.3.2 Το γονίδιο PNPLA3

Το γονίδιο PNPLA3 κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 481 αμινοξέα, την αδιπονουτρίνη, η οποία εκφράζεται στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό (Umano et al., 2017). Οι πρώτες μελέτες σάρωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος (GWAS) αποκάλυψαν νέους γενετικούς τόπους που έχουν σχέση με τη νόσο, με πιο γνωστό ταυτοποιημένο τον πολυμορφισμό rs738409 του γονιδίου PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3/adiponutrin (ADPN)) (Miura et al., 2010). Συνεπώς, ο ρόλος του αλληλόμορφου G του πολυμορφισμού rs738409 του γονιδίου PNPLA3 στην εμφάνιση της νόσου NAFLD έχει τεκμηριωθεί και, έτσι, θεωρείται ως ο κύριος γενετικός παράγοντας για την εμφάνιση της NAFLD και της NASH.

1.3.3 Το γονίδιο TM6SF2

Το γονίδιο TM6SF2 κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία ρυθμίζει τη φυσιολογική έκκριση των VLDL από το ήπαρ. Η πρωτεΐνη εκφράζεται έντονα στο ήπαρ, τους νεφρούς και το λεπτό έντερο (Umano et al., 2017). Στον πολυμορφισμό rs58542926 υπάρχει αντικατάσταση αδενίνης από γουανίνη, που οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος από γλουταμινικό οξύ σε λυσίνη. Οι πρώτες μεγάλες μελέτες έδειξαν συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ηπατική συσσώρευση τριγλυκεριδίων (Umano et al., 2017), γεγονός που επιβεβαιώθηκε από knockdown μελέτες σε ποντίκια. Σύμφωνα με μετα-ανάλυση, οι φορείς του αλληλόμορφου A είχαν 2,13 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για τη NAFLD (Pirola & Sookoian, 2015).

1.3.4 Το γονίδιο GCKR

Για πρώτη φορά δύο μεγάλες GWA μελέτες εντόπισαν τον πολυμορφισμό rs780094 στο γονίδιο GCKR (glucokinase regulator) και ανέδειξαν τη σχέση του με τη NAFLD (Speliotes et al., 2011; Champers et al., 2011). Η γλυκοκινάση συμμετέχει στη φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη, δηλαδή στο πρώτο διαδοχικό στάδιο της γλυκόλυσης. Παρουσία του ρυθμιστή της γλυκοκινάσης η λειτουργία της γλυκοκινάσης αναστέλλεται. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της GCKR οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ροή γλυκόζης στα ηπατοκύτταρα, γεγονός που επάγει τη de novo λιπογένεση και την ηπατική στεάτωση (Sookoian & Pirola, 2011). Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν περισσότεροι από 21 πολυμορφισμοί του ίδιου γονιδίου, με πιο σημαντικό τον rs1260326 C/T, ο οποίος έχει ισχυρή συσχέτιση με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, με την ηπατική στεάτωση και τη NASH (Beer et al., 2009).

1.3.5 Τα γονίδια PPP1R3B και LYPLAL1

Το γονίδιο PPP1R3B κωδικοποιεί το ένζυμο πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1). Η τελευταία είναι ρυθμιστής της αποδόμησης του γλυκογόνου, συμμετέχοντας στο μεταβολισμό της γλυκόζης στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες (Krawczyk et al., 2017). Το γονίδιο LYPLA1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με πιθανή δράση λιπάσης στα υποστρώματα βραχείας αλυσίδας (Agius, 2008). Σε μετα-ανάλυση τεσσάρων μελετών GWA (Speliotes, 2011), ο πολυμορφισμός rs4240624 του γονιδίου PPP1R3B βρέθηκε ότι σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τη NAFLD. Στην ίδια μετα-ανάλυση, βρέθηκε θετική συσχέτιση με τη νόσο και για τους πολυμορφισμούς PNPLA3 rs738409 και NCAN rs2228603. Έπειτα της μετα-ανάλυσης, έγινε γονοτύπηση των πολυμορφισμών αυτών, καθώς και άλλων που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο, σε 592 ασθενείς και 1.405 υγιείς, όπου βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στη NAFLD και πολυμορφισμούς στα γονίδια GCKR (rs780094), LYPLAL1 (rs12137855,) NCAN (rs2228603) και PNPLA3 (rs738409), χωρίς, εντούτοις, να βρεθεί συσχέτιση στο γονίδιο PPP1R3B (rs4240624). Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο LYPLAL1 δεν φαίνεται να επηρεάζει τα μεταβολικά χαρακτηριστικά, ωστόσο πιθανόν έχει ρόλο στα διαδοχικά στάδια αποικοδόμησης των τριγλυκεριδίων αναστέλλοντας την αποικοδόμησή τους, με αποτέλεσμα την προώθηση της ηπατικής στεάτωσης, σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό στο γονίδιο PPP1R3B, ο οποίος τα επηρεάζει (Speliotes, 2011). Τέλος, οι επιδράσεις, συνολικά, των PNPLA3 και LYPLAL1 πολυμορφισμών φαίνεται ότι δρουν απευθείας στο ήπαρ, χωρίς να υπεισέρχονται στα μεταβολικά χαρακτηριστικά των ασθενών, ενώ, αντίθετα, οι πολυμορφισμοί των γονιδίων GCKR, PPP1R3B και NCAN επηρεάζουν αυτά τα μεταβολικά χαρακτηριστικά.

1.3.6 Το γονίδιο TNF-α

Το γονίδιο του TNF-α είναι μέλος της υπερικογένειας του TNF-α (που αποτελείται από τουλάχιστον 20 διαφορετικά μέλη). Το TNF-α διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή, την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, την απόπτωση και το μεταβολισμό των λιπιδίων. Το TNF-α εμπλέκεται, επίσης, σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων του άσθματος και της νόσου Crohn. Σχετικά με τη νόσο NAFLD, σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού 238 του εκκινητή στο γονίδιο TNF-α και της NAFLD. Συγκεκριμένα, στη μελέτη η συχνότητα ομόζυγων και ετερόζυγων για το αλληλόμορφο A ήταν 23,7% στους ασθενείς με NAFLD και 13,9% στους υγιείς. Συνεπώς, προτάθηκε πως ο πολυμορφισμός αυτός αυξάνει τον κίνδυνο για νόσο (Wang, 2012).

1.3.7 Το γονίδιο SLC30A8

Η οικογένεια φορέων διαλύτη 30 (μεταφορέας ψευδαργύρου), μέλος 8, επίσης γνωστό ως γονίδιο SLC30A8, είναι ένα ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί έναν μεταφορέα ψευδαργύρου (ZnT8) που σχετίζεται με την έκκριση ινσουλίνης στους ανθρώπους (Sladek, Rocheleau, Rung et al., 2007). Ορισμένα αλληλόμορφα στοιχεία αυτού του γονιδίου μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2, αλλά μια μετάλλαξη απώλειας λειτουργικότητας φαίνεται ότι μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο διαβήτη (Sladek, Rocheleau, Rung et al., 2007).

Ωστόσο, 12 σπάνιες παραλλαγές στο SLC30A8 έχουν ταυτοποιηθεί μέσω της αλληλούχησης ή της γονοτύπησης περίπου 150.000 ατόμων από πέντε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες (Sladek, Rocheleau, Rung et al., 2007). Το γονίδιο SLC30A8 περιέχει μια κοινή παραλλαγή (p.Trp325Arg), η οποία σχετίζεται με τον κίνδυνο T2D και τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και προϊνσουλίνης. Τα άτομα που έφεραν παραλλαγές περικοπής πρωτεϊνών συνολικά είχαν 65% μειωμένο κίνδυνο T2D.

Παλαιότερες μελέτες του SLC30A8 έδειξαν ότι η μειωμένη μεταφορά ψευδαργύρου αύξησε τον κίνδυνο T2D. Αντιστρόφως, οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας σε μελέτες σε ανθρώπους υποδεικνύουν ότι προστατεύουν από τον T2D. Επομένως, η αναστολή της ZnT8 μπορεί να χρησιμεύσει ως θεραπευτική στρατηγική στην πρόληψη της T2D.

1.3.8 Το γονίδιο SOD1

Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs) αποτελούν μια ομάδα ενζύμων που περιέχουν μέταλλα και διαδραματίζουν έναν ζωτικό αντιοξειδωτικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, η λειτουργία τους είναι η απομάκρυνση ενός από τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου, του ανιόντος υπεροξειδίου. Τρεις τύποι SODs είναι γνωστοί στους ανθρώπους, με το πλέον γνωστό να είναι το κυτοσολικό SOD1, που αναγνωρίζεται από τις προσθετικές ομάδες μετάλλων Cu, Zn. Η παρουσία αυτών των μετάλλων και ο συντονισμός με ορισμένα αμινοξέα είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του. Τα SODs είναι μεταξύ των πρώτων γραμμών άμυνας στην αποτοξίνωση των προϊόντων που προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες. Στο SOD1 έχει μεγάλη σημασία ο συντονισμός με άλλα ένζυμα σάρωσης ROS ως προς την οδό αποτοξίνωσης. Πρέπει να τονιστεί ότι η επίδραση των διατροφικών ελλειμμάτων σε μέταλλα (χαλκός ή ψευδάργυρος) ή η εσφαλμένη ενσωμάτωση μεταλλικών ιόντων επιδρούν στη λειτουργία του SOD1. Τέλος, υπάρχουν καταγεγραμμένες ανθρώπινες παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται είτε με τη δυσλειτουργία του SOD1 είτε με μειωμένη δραστηριότητά του (Johnson & Giulivi, 2005).

1.4 CRP και μέταλλα (Zn, Cs, Tl) στη NAFLD

1.4.1 Γονίδια - πολυμορφισμοί και επίπεδα μετάλλων

Τα μέταλλα μπορούν να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση και αυτό έχει γίνει κατανοητό εδώ και δεκαετίες. Αρχικά, τα πειράματα ανάπτυξης που συνδέθηκαν με την προσθήκη ιχνοστοιχείων στα θρεπτικά συστατικά, τόσο των φυτών όσο και των ζώων, υποστήριξαν αυτή την υπόθεση. Μετά από αυτό ήρθε η απόδειξη από τα ένζυμα που σχετίζονται με τη βιοχημεία των νουκλεϊνικών οξέων και τα οποία ονομάζονται μεταλλοένζυμα, εφόσον καθιέρωσαν τη σχέση έκφρασης μετάλλου-γονιδίου.

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί απαιτούν μέταλλα ώστε να διατηρούν διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Για παράδειγμα, το ασβέστιο, το οποίο δεν επηρεάζει άμεσα τη γονιδιακή έκφραση, μπορεί να το κάνει έμμεσα μέσω των δευτερευόντων ρόλων του. Επιπλέον, τα ιχνοστοιχεία που απαιτούνται στη διατροφή περιλαμβάνουν το χαλκό, το σίδηρο, το μαγγάνιο, το νικέλιο, το σελήνιο και τον ψευδάργυρο. Στους ανθρώπους αυτά τα ιχνοστοιχεία απαιτούνται σε ποσότητες της τάξης των μικρογραμμάτων έως χιλιοστόγραμμων ανά ημέρα. Οι κυτταρικοί μηχανισμοί ελέγχουν τη μεταφορά ιχνοστοιχείων μέσα και έξω από τα κύτταρα, έτσι ώστε οι επιδράσεις της φυσικής αφθονίας και των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων να μην επηρεάζουν το κυτταρικό περιεχόμενο και τη λειτουργία συγκεκριμένων μετάλλων (da Silva and Williams, 1991).

Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί αυτοί είναι δυνατόν να επηρεαστούν από πολύ υψηλές εισροές ενός μεταλλικού ιχνοστοιχείου.

Υπάρχουν τρεις τρόποι που τα μέταλλα μπορούν να εμπλακούν στην έκφραση γονιδίων. Ο ένας είναι δομικός, όπου τα μέταλλα διευκολύνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων ομάδων δέσμευσης, καθώς παρέχουν την κατάλληλη διαμόρφωση που είναι απαραίτητη για αλληλεπιδράσεις, όπως μεταξύ συγκεκριμένων πρωτεϊνών και DNA (Cousins, 1995). Ο δεύτερος τρόπος εμπλοκής είναι καταλυτικός, όπου το μέταλλο απαιτείται για τη δράση ενός ενζύμου που σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων, ενώ ο τρίτος τρόπος περιλαμβάνει ειδικές ρυθμίσεις όπου η ύπαρξη ενός μετάλλου και η αλληλεπίδραση με μια πρωτεΐνη μεταβάλλει τη μεταγραφή ενός συγκεκριμένου γονιδίου.

Πολλά περισσότερα είναι γνωστά για τη συμμετοχή του ψευδαργύρου στη γονιδιακή έκφραση. Η ενδοκυτταρική συγγένεια είναι μεγαλύτερη για τον ψευδάργυρο απ' ό,τι σχεδόν για όλα τα άλλα μέταλλα που βρίσκονται στα κύτταρα, με εξαίρεση το χαλκό. Εντούτοις, αντίθετα με τον σίδηρο, ο ψευδάργυρος δεν εμφανίζει οξειδοαναγωγική χημεία, αλλά έχει τις ιδιότητες ενός οξέος Lewis, ενώ παρουσιάζει και ταχεία ανταλλαγή υποκαταστατών, κάτι που είναι σημαντικό για τον καταλυτικό ρόλο του (da Silva και Williams, 1991).

Η επίδραση πολυμορφισμών διαφόρων γονιδίων στα επίπεδα μετάλλων στο αίμα δεν είναι κάτι καινούριο. Συγκεκριμένα, υπάρχει το παράδειγμα των μεταλλοθειονίνων (MT) χαμηλού μοριακού βάρους που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη. Λόγω των πλούσιων ομάδων θειόλης τους, οι MT συνδέονται βιολογικά με μέταλλα και δημιουργούν δεσμούς, ενώ βοηθούν στη μεταφορά και την εξαγωγή τους. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη (Kayaalti et al., 2011) τα άτομα με το γονότυπο GG στο γονίδιο MT2A είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο Zn και υψηλότερα επίπεδα Cd και Pb στα δείγματα αίματος, σε σχέση με τα άτομα με γονότυπους AA και AG.

1.4.2 Ψευδάργυρος και συσχέτιση με ήπαρ και μεταβολισμό

Ο ψευδάργυρος (Zn) είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο με διάφορες βιολογικές επιδράσεις, ανάλογα με τον καταλυτικό και δομικό του ρόλο. Επιπλέον, υπάρχει σε έναν τεράστιο αριθμό ενζύμων και πρωτεϊνών σχηματίζοντας Zn-δακτυλίους. Οι ρυθμιστικές λειτουργίες του Zn και των αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τη συμμετοχή των ιόντων Zn στον έλεγχο

της δομής πρωτεϊνών, στη μεταγωγή σήματος και σε περιπτώσεις όπου η σύνδεση και η απελευθέρωση του Zn είναι υπό οξειδοαναγωγικό έλεγχο.

Ο ψευδάργυρος ενεργεί, επίσης, ως συμπράγοντας ανάπτυξης, είναι σημαντικός ανοσορυθμιστής και κυτταροπροστατευτικός παράγοντας με αντιοξειδωτικές και αντιαποπτωτικές ιδιότητες, καθώς και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Ο ρόλος του στη γήρανση είναι ιδιαίτερα σημαντικός, δεδομένου ότι εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση του DNA και την πρόληψη ανάπτυξης των νεοπλασματικών κυττάρων. Είναι, επίσης, γνωστό ότι ο Zn δρα ως νευρορυθμιστής σε διεγερτικές συνάψεις, παρουσιάζοντας σημαντική επίδραση στην αντίδραση στο στρες και συμβάλλοντας στη διατήρηση της αντισταθμιστικής ικανότητας του εγκεφάλου.

Η ομοιόσταση του Zn ρυθμίζεται, κυρίως, από το γαστρεντερικό σωλήνα μέσω αναπροσαρμογών της απορρόφησης Zn από το έντερο και την ενδογενή απέκκριση στα κόπρανα. Ψευδαργυρική ανεπάρκεια εμφανίζεται ως αποτέλεσμα διατροφικών παραγόντων (χαμηλή διατροφική πρόσληψη), αλλά και σε διάφορες χρόνιες ασθένειες (δυσασπορρόφηση, νόσος του Crohn, αλκοολισμός, κίρρωση του ήπατος, χρόνια νεφρική νόσο, δρεπανοκυτταρική αναιμία κ.ά.). Ο Zn είναι απαραίτητος για την κανονική ηπατική λειτουργία, και αντίστροφα. Το ήπαρ διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ομοιόσταση του Zn και, κατά συνέπεια, οι ασθένειες του ήπατος επηρεάζουν τα επίπεδα Zn, ενώ η ανεπάρκεια Zn μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεσή τους.

Η ψευδαργυρική ανεπάρκεια προκαλεί οξειδωτικό στρες (Powell, 2000), καθώς και συνθήκες που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, όπως ευπάθεια σε ηπατίτιδα, απώλεια της ανταπόκρισης σε προστασία έναντι της ηπατίτιδας και οξείδωση των λιπιδίων (DiSilvestro, 2000; Parsons et al., 1994). Η ανεπάρκεια Zn μεταβάλλει επίσης την κυτταρική οξειδωτική κατάσταση, ενώ επιπλέον η ανεπάρκεια μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση ήπατος (Prasad et al., 1994).

1.4.3 Μεταβολισμός ψευδαργύρου, ήπαρ - γονίδια

Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση Zn. Ο Zn στον ορό είναι ένα μικρό ποσοστό (μόνο 0,1%) από την περιεκτικότητα ψευδαργύρου σε ολόκληρο το σώμα. Ιστοί, όπως οι μυς, τα οστά, ο αδένας του προστάτη, το ήπαρ και ο νεφρός, αποθηκεύουν το μεγαλύτερο μέρος του Zn. Σε περιοχές με ανεπάρκεια Zn αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα Zn παρέμειναν σταθερά σε

ορισμένους ιστούς, όπως τα μαλλιά, το δέρμα και τους σκελετικούς μύες, ενώ στο πλάσμα, το ήπαρ και τους όρχεις μειώθηκαν.

Το ήπαρ αποτελεί μια ταχέως ανταλλάξιμη αποθήκη Zn με ένα σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του Zn και άλλων ιχνοστοιχείων (Krebs, 2001). Τα γλυκοκορτικοειδή, οι βακτηριακές ενδοτοξίνες και οι κυτοκίνες μειώνουν τα επίπεδα Zn στο πλάσμα, ενώ ο Zn αναδιανέμεται στο ήπαρ. Ο ενδοκυτταρικός μεταβολισμός Zn ρυθμίζεται μέσω πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την πρόσληψη, την ενδοκυτταρική διακίνηση και τη «στεγανοποίηση» του Zn. Οι ZIP πρωτεΐνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσληψη του Zn, ενώ οι μεταφορείς Zn (ZnT), που αποτελούνται από επτά πρωτεΐνες, εμπλέκονται στην ενδοκυτταρική διακίνηση του Zn.

Η ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση Zn επιτυγχάνεται μέσω δέσμευσης μεταλλοπρωτεϊνών, όπως MT (Maret, 2003). Οι MT είναι πλούσιες σε κυστεΐνη πρωτεΐνες που δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα, τα οποία είναι σημαντικά για το μεταβολισμό του Zn στο ήπαρ. Ο ρόλος των MT στα κύτταρα περιλαμβάνει ελεύθερη αποσιδήρωση μεταλλικών ιόντων, ρύθμιση των επιπέδων και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς των μετάλλων, αποτοξίνωση από τοξικά μέταλλα, όπως κάδμιο (Cd), χαλκό (Cu) και υδράργυρο (Hg), και προστασία των κυττάρων έναντι οξειδωτικού στρες (Theocharis et al., 2003; Theocharis et al., 2004; Henkel & Krebs, 2004). Οι κυτοκίνες, όπως η IL-1, η IL-6, τα γλυκοκορτικοειδή και τα μέταλλα, ρυθμίζουν τη σύνθεση MT. Παρουσία ψευδαργύρου η σύνθεση MT αυξάνεται, ενώ με έλλειψη Zn έχουμε το αντίθετο αποτέλεσμα.

Ο Zn ρυθμίζει την παραγωγή MT μέσω της άμεσης και αναστρέψιμης δέσμευσης με τον Zn-finger τομέα του μεταγραφικού παράγοντα-1 (MTF-1). Αυτή η πρωτεΐνη στη συνέχεια υιοθετεί μια διαμόρφωση και μετατοπίζει τη δέσμευση του DNA στον πυρήνα, όπου συνδέεται με μεταλλικά στοιχεία-απόκρισης (MRE) σε υποκινητές γονιδίων, και οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του Zn (Andrews, 2001). Σχεδόν το 90% του ενδοκυττάριου Zn δεσμεύεται με πρωτεΐνες και, ως εκ τούτου, ο ελεύθερος ή χαλαρά δεσμευμένος ενδοκυτταρικός Zn είναι πολύ λίγος.

Παρόλα αυτά, ο ασταθής Zn ρυθμίζει σημαντικές Zn-εξαρτώμενες διεργασίες, οι οποίες περιλαμβάνουν μεταγωγή σήματος, απόπτωση και νευροδιαβίβαση (Truong-Tran & Carter,

2001; Truong-Tran & Grosser, 2003; Eide, 2003). Μειωμένα ηπατικά επίπεδα Zn έχουν συσχετισθεί με μειωμένη ηπατική λειτουργία και αναγέννηση (Grungreiff, 2002). Επίσης, ποντίκια με ανεπαρκή Zn είχαν μειωμένο οξειδωτικό μεταβολισμό των φαρμάκων, λόγω της μειωμένης έκφρασης στο κυτόχρωμα P 450 (Xu et al., 1994).

Η ανεπάρκεια Zn θα μπορούσε να συμμετέχει στην παθογένεια της κίρρωσης ήπατος. Οι επιδράσεις του Zn κατά την επαγωγή ίνωσης μπορεί να χαρακτηριστούν είτε ως άμεσες είτε ως έμμεσες. Πιο συγκεκριμένα, ο Zn θα μπορούσε άμεσα να επηρεάζει την ινωτική διαδικασία, επηρεάζοντας τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών και των ενζύμων που συμμετέχουν στην σύνθεση και αποικοδόμηση του κολλαγόνου (π.χ., προπυλο-υδροξυλάση, κολλαγενάση και MMPs) (Camps et al., 1992; Kojima-Yuasa et al., 2003; Dashti et al., 1997). Επιπλέον, *in vivo* και *in vitro* μελέτες έδωσαν αποδείξεις ότι συμπληρώματα με Zn ήταν σε θέση να αναστείλουν τη δραστηριότητα της προπυλο-υδροξυλάσης, ένα βασικό ένζυμο για τη σύνθεση κολλαγόνου (Cabre et al., 1999; Camps et al., 1992; Anttinen et al., 1994). Έμμεσα ο Zn θα μπορούσε να αναστείλει την ινωτική διαδικασία με την αντιφλεγμονώδη, αντιαποπτωτική και αντιοξειδωτική του δράση και ελέγχοντας τη λειτουργία των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων (HSCs), που παίζουν έναν κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του κολλαγόνου στο ήπαρ. Μια θεωρία για το ρόλο του Zn στην παθογένεση της κίρρωσης του ήπατος είναι ότι η ανεπάρκεια Zn, επαγόμενη από χρόνια ηπατική νόσο, ενισχύει το οξειδωτικό στρες στο ήπαρ και, ως εκ τούτου, την ινωτική διαδικασία.

Άλλες βιολογικές λειτουργίες του Zn (π.χ., στο ανοσοποιητικό σύστημα και την απόπτωση) θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη ζημία που προκλήθηκε από οξειδοαναγωγικές ανισορροπίες. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανεπάρκεια Zn μπορεί να έχει άμεση επίδραση στην ενεργοποίηση των HSCs (Kojima-Yuasa et al., 2003).

Η επίδραση των επιπέδων Zn στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του ηπατοκυττάρου σε σχέση με την ινωτική διαδικασία έχει μελετηθεί εκτενώς (Loquercio et al., 2001; Cabre et al., 2000). Η Zn ανεπάρκεια ενισχύει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από διάφορες ηπατοτοξίνες (Sullivan & Jetton, 1980; Disilvestro & Carlson, 1994), ενώ συμπλήρωμα Zn μπορεί να καθυστερήσει την ίνωση και να μειώσει τη λιπιδική υπεροξείδωση (Chvapil et al., 1973; Ferre et al., 1999; Zhou et al., 2002).

Χορήγηση Zn σε αρουραίους πριν από την έκθεση σε CCl₄ ανέστειλε τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA ηπατικών κυττάρων, ο οποίος συνδέεται με την απόπτωση (Cabre et al., 1999). Η ηπατοπροστατευτική δράση του Zn κατά του οξειδωτικού στρες γίνεται μέσω της ρύθμισης του μεταβολισμού των SODs, MTs, GSH και άλλων αντιοξειδωτικών, όπως οι βιταμίνες E και C (Kojima-Yuasa et al., 2003; Cabre et al., 1999; Abul et al., 2002).

1.4.4 Ψευδάργυρος και πολυμορφισμοί που συνδέονται με ηπατικές παθήσεις

Με βάση τη βιβλιογραφία, βλέπουμε ότι η ανεπάρκεια Zn εμπλέκεται σε πολλές παθήσεις του ήπατος (Stamoulis et al., 2007; Mohammad et al., 2012; Estácio et al., 2015; Sea et al., 2015; Sakiyama et al., 2016). Το γονίδιο SIRT1 στον άνθρωπο κωδικοποιεί τις σιρτουίνες που λειτουργούν ως ενδοκυτταρικοί ρυθμιστές. Συγκεκριμένα, το γονίδιο SIRT1 συνδέεται με τον ψευδάργυρο (Chen et al., 2009; Colak & Yasar, 2017), εφόσον ο Zn συνδέεται ως χηλικό σύμπλοκο με τις σιρτουίνες. Επίσης, βάσει της βιβλιογραφικής αναφοράς (Chakrabarty & Balaram, 2017) φαίνεται ότι ο ψευδάργυρος εμπλέκεται και με τη SIRT2. Δηλαδή, βάσει αυτής της μελέτης, ο ψευδάργυρος παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με τη SIRT2 και, όταν απομακρυνθεί το μέταλλο, το σύμπλοκο υφίσταται αποδόμηση, η οποία είναι αντιστρεπτή με την επαναφορά του.

Συγκεκριμένα, σχετικά με το γονίδιο SIRT2, υπάρχει ο πολυμορφισμός rs892034 που εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την παχυσαρκία σε παιδιατρικό πληθυσμό (Aguilera et al., 2013). Προχωρώντας παρακάτω, με βάση μελέτη των Miele et al. (2008) για το γονίδιο KLF6, υπάρχει ο πολυμορφισμός rs3750861 που εμπλέκεται στον καρκίνο του ήπατος. Επίσης, το γονίδιο SOD1 εμπλέκεται με ασθένειες του ήπατος (Estácio et al., 2015; Sea et al., 2015; Sakiyama et al., 2016). Στη συνέχεια, στον Πίνακα 4, γίνεται μια βιβλιογραφική καταγραφή διαφόρων γονιδίων και πολυμορφισμών που έχουν καταγραφεί σε γονίδια ρύθμισης ψευδαργύρου και διάφορες νόσους.

Πίνακας 4. Κατάλογος γονιδίων και πολυμορφισμών που αλληλεπιδρούν με Zn και εμπλέκονται σε διάφορες νόσους

Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Συσχέτιση με νόσο	Βιβλιογραφία
SLC39A4		Εντεροπαθητική ακροδερματίτιδα	Zhou et al., 2002
IL-6	rs1800795		
MT1a	rs11640851	Αυξημένη παραγωγή IL-6, ομοιόσταση του ψευδαργύρου, πιθανό ηπατοπροστατευτικό αποτέλεσμα της IL-6, μείωση του οξειδωτικού στρες και αποτροπή της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας	Teoh et al., 2006; Klein, 2005; Cressman et al., 1996; El Assal, 2004; Kishimoto, 2017; Mazzati et al., 2008
SLC30A8	rs11558471, rs13266634	Αύξηση γλυκόζης, μπορεί να επηρεάζεται από τη λήψη Zn, εμπλοκή στο διαβήτη τύπου 2	Kanoni et al., 2011
SLC39A		Κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο καρκίνου του μαστού	Mazzati et al., 2008; Ueyama et al., 2016
SLC30A2		Εντεροπαθητική ακροδερματίτις, προκαλεί απώλεια της δραστηριότητας μεταφορέων ψευδαργύρου	Jagadeesan, 2018
PNPLA3	rs738409	Μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου που σχετίζεται με HCC	Ueyama et al., 2016
JAZF1	rs864745	G ήταν σημαντικά υψηλότερη μεταξύ των ατόμων DM-HCC* από τα άτομα DM-non-HCC**	Manolio et al., 2010
SIRT2	rs892034	Αρνητική συσχέτιση με την παχυσαρκία σε παιδιατρικό πληθυσμό	Aguilera et al., 2013
KLF6	rs3750861	Εμπλέκεται στον καρκίνο του ήπατος	Miele et al., 2008
SOD1		Εμπλέκεται με ασθένειες του ήπατος	Estácio et al., 2015; Sea et al., 2015; Sakiyama et al., 2016

*DM-HCC: Σακχαρώδης διαβήτης και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

**DM-non-HCC: Σακχαρώδης διαβήτης χωρίς ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

SLC39A4: Διαμεμβρανική πρωτεΐνη, οικογένεια φορέων διαλυτής ουσίας 39 (μεταφορέας ψευδαργύρου), μέλος 4
IL-6: Ιντερλευκίνη 6

MT1a: Μεταλοθειονίνη 1A

SLC30A8: Οικογένεια φορέων διαλυτής ουσίας 30 (μεταφορέας ψευδαργύρου), μέλος 8

SLC39A: Οικογένεια φορέων διαλυτής ουσίας 39 (μεταφορέας ψευδαργύρου), ελέγχει την εισροή ψευδαργύρου στο κυτταρόπλασμα

SLC30A2: Οικογένεια φορέων διαλυτής ουσίας 30 (μεταφορέας ψευδαργύρου), μέλος 2

PNPLA3: Η πρωτεΐνη 3 που περιέχει φωσφολιπάση και μοιάζει με πατατίνη

JAZF1: Πρωτεΐνη δακτυλίου ψευδαργύρου 1

SIRT2: NAD-εξαρτώμενη δεακετυλάση σιρτουίνης 2

KLF6 : Krueppel - όπως πρωτεΐνη 6

SOD1: Υπεροξειδίου δισμουτάση [Cu-Zn]

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία από τους Πίνακες 2 και 3 και τη λίστα πολυμορφισμών που αναπαριστούν, βρέθηκαν κάποιοι από αυτούς να αλληλεπιδρούν με ψευδάργυρο και να επηρεάζουν ηπατικές και μεταβολικές νόσους:

- ✓ Το γονίδιο GCKR και ο πολυμορφισμός rs1260326. Συγκεκριμένα, το γονίδιο GCKR παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα στο ήπαρ. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το T allele του rs1260326 συσχετίζεται με διαβήτη τύπου 2 και υπερτριγλυκαιμία (Reiling et al., 2009)
- ✓ Το γονίδιο MTHFR και οι πολυμορφισμοί C677T και A1298C συνδέονται έμμεσα με ανεπάρκεια Zn μέσω αύξησης Cu (Sneed, 2016).

- ✓ Το γονίδιο ADIPOQ που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αδιπονεκτίνης, η οποία είναι μία λιποκυτταρική ορμόνη με αντιαθηρογόνο, αντιδιαβητική και αντιφλεγμονώδη δράση. Στο ήπαρ η αδιπονεκτίνη εξασθενεί την αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Εκτός αυτού, η αδιπονεκτίνη αυξάνει το ενδοθηλιακό νιτρικό οξείδιο (NO) και αναστέλλει την προσκόλληση μονοκύτταρων και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων των λείων μυών στο αγγειακό τοίχωμα (Diez et al., 2003; Chandran et al., 2003). Στους ασθενείς με NAFLD υπάρχει συστηματική μείωση της αδιπονεκτίνης (Buechler et al., 2011). Ο πολυμορφισμός rs266729 θα μπορούσε να διερευνηθεί για συσχέτιση με τη νόσο NAFLD (Hashemi et al., 2013), εφόσον οδηγεί σε υποαδιπονεκτιναιμία που προωθεί τη στεάτωση σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Αν συνδυαστεί με το ότι παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της αδιπονεκτίνης μετά τη λήψη συμπληρώματος ψευδάργυρου (50mg ψευδαργύρου θειικό) καθημερινά για 12 εβδομάδες (Aleidi et al., 2015), τότε θεωρητικά θα μπορούσε να ελεγχθεί ο πολυμορφισμός rs266729 σε συσχέτιση με τον Zn.

1.4.5 Μεταβολισμός κασίου και NAFLD - γονίδια και πολυμορφισμοί

Το καίσιο (Cs) δεν κατηγοριοποιείται ως βαρύ μέταλλο, αλλά είναι ένα από τα βαρύτερα σταθερά αλκαλικά μέταλλα, το οποίο έχει πολλές εφαρμογές, όπως σε ατομικά ρολόγια ή ως αντιδραστήρια φυγοκέντρησης. Η συγκέντρωση του φυσικού κασίου σε αέρα και νερό είναι πολύ χαμηλή, λιγότερο από 1ng και 1μg ανά κυβικό μέτρο αέρα και νερού, αντίστοιχα. Τελικά, όμως, ο μέσος όρος κατανάλωσης κασίου από ένα άτομο κυμαίνεται έως περίπου 10μg ανά ημέρα σε τρόφιμα και νερό και περίπου 0,025μg ανά ημέρα μέσω της εισπνοής. Η συγκέντρωση του Cs σε φυτά και ζώα μπορεί διαφέρει από 1ng/g έως 300ng/g.

Το Cs κατά την είσοδο στο σώμα, είτε ως φυσικό στοιχείο είτε σε ραδιενεργή μορφή, απορροφάται σχεδόν πλήρως και διανέμεται σε όλο το σώμα με αισθητά υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης στους νεφρούς, στους σκελετικούς μύες, στο ήπαρ και τα ερυθροκύτταρα (Leggett et al., 2003; Rossof et al., 1963). Πρωταρχικά, το Cs απεκκρίνεται μέσω των νεφρών με τη μορφή ούρων, μέσω μηχανισμού που είναι παρόμοιος με την απέκκριση του καλίου (Leggett et al., 2003). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει άμεση σύνδεση ή αλληλεπίδρασεις του Cs με ανθρώπινες ασθένειες και, πιο συγκεκριμένα, με γονίδια και πρωτεΐνες.

Στον Πίνακα 5 τοποθετούνται πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αλληλεπίδραση με CsCl, ενώ η ανίχνευση έγινε βάσει του λογισμικού STITCH 4.0. Όσο μεγαλύτερη τιμή έχει το σκορ τόσο πιο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση.

Πίνακας 5. Κατάλογος γονιδίων που αλληλεπιδρούν με CsCl και σκορ αλληλεπίδρασης (Taif et al., 2017, p. 291)

Πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης με Cs*	Περιγραφή	Σκορ αλληλεπίδρασης με Cs**
GNAL1	Guanine nucleotide binding protein	0.929
FTL	Ferritin light polypeptide	0.907
KDR	Kinase insert domain receptor	0.907
DNYLRB1	Dynein light chain roadblock-type 1	0.900
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	0.900
POLB	Polymerase (DNA directed), beta	0.900
GRIK1	Glutamate receptor, ionotropic, kinase 1	0.865
ACY3	Aspartoacylase (aminocyclase) 3	0.853
KCNJ6	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6	0.851
IGK	Immunoglobulin kappa constant	0.844

* Πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αλληλεπίδραση με CsCl

** Η ανίχνευση έγινε βάσει του λογισμικού STITCH 4.0. Όσο μεγαλύτερη τιμή έχει το σκορ τόσο πιο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-CsCl

Βιβλιογραφικά υπάρχει ένα γονίδιο, το GRIK1, και συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός rs455804, που συνδέεται με καρκίνο ήπατος (Li et al., 2012)

Η συμπεριφορά του Cs 137 στον άνθρωπο μετά από χρόνια πρόσληψη προβλέπεται σήμερα με τη χρήση των δεδομένων για το κάλιο, δεδομένης της ομοιότητας στη βιολογική συμπεριφορά αυτών των δύο στοιχείων (Leggett et al., 2003). Επιπλέον, τα βιοκινητικά μοντέλα της ICRP (ICRP 1989) που χρησιμοποιούνται σήμερα για τον υπολογισμό του κινδύνου για την υγεία υποθέτουν ότι οι καταστάσεις χρόνιας έκθεσης εξομοιώνονται με μια σειρά οξείας έκθεσης σε χαμηλή συγκέντρωση. Ωστόσο, προηγούμενα αποτελέσματα για τη βιοκινητική του ουρανίου (Monleau et al., 2005) έχουν ήδη δείξει ότι αυτές οι υποθέσεις μπορεί να είναι λανθασμένες. Οι πρώτες μελέτες για το καίσιο 137 επεδίωξαν να προσδιορίσουν το βιοκινητικό προφίλ του μετά από χρόνια κατάποση σε δύο μοντέλα τρωκτικών –αρουραίων και ποντικών.

Επιπλέον, διαταραγμένη χοληστερόλη πλάσματος καθώς και επίπεδα τριγλυκεριδίων έχουν παρατηρηθεί σε άτομα που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία κατά τη διάρκεια του ατυχήματος του Τσερνομπίλ (Chailo et al., 1991). Στην πραγματικότητα είναι πλέον αποδεκτό ότι ο μεταβολισμός της χοληστερόλης στο ήπαρ είναι πρωταρχικός για την ομοιοστάση του πλάσματος (Ory et al., 2004) και η διατάραξή του προκαλεί ηπατικά και καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως αθηροσκλήρωση και δυσλιπιδαιμία (Libby et al., 2000). Φαίνεται ότι μετά από τρεις μήνες έκθεση σε νερό εμπλουτισμένο με Cs παρουσιάστηκε στατιστική σημαντική αύξηση

στα mRNA επίπεδα των LDL-R, ApoB, LXRα, CYP27A1 και μείωση του ABCG5. Τέλος, οι πολυμορφισμοί p.Asn439Lys και p.Asp445Asn μπορεί να παρεμβαίνουν στις αλληλεπιδράσεις δέσμευσης της πρωτεΐνης MTHFD1 με το καΐσιο και το κάλιο (Mansi et al., 2017).

1.4.6 Μεταβολισμός θαλλίου - γονίδια και πολυμορφισμοί

Το Tl συσσωρεύεται σε ιστούς με υψηλές συγκεντρώσεις καλίου, όπως στους μύες, την καρδιά και τον κεντρικό και περιφερικό νευρικό ιστό. Το Tl έχει ίδιο μέγεθος με το κάλιο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόωρη διέγερση και, στη συνέχεια, την αναστολή των διαδικασιών που εξαρτώνται από το κάλιο. Τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στην τοξικότητα του θαλλίου περιλαμβάνουν την πυροσταφυλική κινάση και την ηλεκτρική αφυδρογονάση. Η αναστολή τους οδηγεί σε διαταραγμένο μεταβολισμό της γλυκόζης, καθώς και σε διαταραχή του κύκλου του Krebs, κάτι που οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ATP. Επιπλέον, επηρεάζεται η ATPase νατρίου-καλίου, με αποτέλεσμα τον τραυματισμό της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτός ο ενζυματικός τραυματισμός έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωση των μιτοχονδρίων και το κυτταρικό θάνατο. Μέσα στα μιτοχόνδρια το θάλλιο προκαλεί, επίσης, απομόνωση της ριβοφλαβίνης, με αποτέλεσμα την αναστολή του FAD, την εξασθένηση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και την περαιτέρω μείωση της ATP.

Όπως συμβαίνει και με άλλα μέταλλα, το Tl έχει υψηλή συγγένεια δισουλφιδικών δεσμών. Συνεπώς, παρεμβαίνει στο σχηματισμό σταυρωτής σύνδεσης με ομάδες κυστεΐνης μειώνοντας το σχηματισμό κερατίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλωπεκία και το σχηματισμό των γραμμών Mees. Η ελάττωση της διασύνδεσης κυστεΐνης οδηγεί, επίσης, σε μειωμένη γλουταθειόνη, με συνέπεια τη συσσώρευση υπεροξειδίων λιπιδίων στον εγκέφαλο, τα οποία είναι πιο εμφανή στην παρεγκεφαλίδα, συχνά θεωρούμενα ως περιοχές σκουρόχρωμης λιποφουσκίνης (Hasan et al., 1981). Το Tl παρεμβαίνει στη σύνθεση πρωτεϊνών βλάπτοντας τα ριβοσώματα, οδηγώντας περαιτέρω σε κυτταρική βλάβη και θάνατο (Hultin et al., 1974). Επιπλέον, το Tl ακολουθεί μια τριπλή φάση τοξικοκινητικής: πρώτη ενδοαγγειακή κατανομή, στη συνέχεια κατανομή στο ΚΝΣ και, τέλος, εξάλειψη. Τις πρώτες τέσσερις ώρες μετά την έκθεση το Tl διανέμεται ταχέως στο αίμα και σε όργανα όπως τους νεφρούς, το ήπαρ και τους μύες. Κατά τη διάρκεια των επόμενων 4-48 ωρών το θάλλιο κατανέμεται στο ΚΝΣ. Η φάση απομάκρυνσης αρχίζει περίπου 24 ώρες μετά την κατάποση. Επίσης, εξαλείφεται κυρίως μέσω της απέκκρισης στα κόπρανα (51,4%) και στα ούρα (26,4%).

Οι υψηλές συγκεντρώσεις Tl που βρίσκονται στους νεφρούς (>5,5 φορές περισσότερο από τους άλλους ιστούς) οφείλονται σε νεφρική διήθηση, όπου το 50% επαναλαμβάνεται στα σωληνάρια των νεφρών. Η εξάλειψη είναι αργή με χρόνο ημίσειας ζωής 3-30 ημέρες και ποικίλλει ανάλογα με τη δόση και τη χρονικότητα της έκθεσης. Λόγω αυτής της παρατεταμένης φάσης εξάλειψης, το θάλλιο μπορεί να λειτουργήσει ως αθροιστικό δηλητήριο. Είναι καταγεγραμμένο ότι αυξημένες ποσότητες θαλλίου, εκτός των άλλων, οδηγούν και σε διαταραχή (αύξηση) γλυκόζης αίματος (Limos et al., 1982; Atsmon et al., 2000). Επίσης, το Tl είναι πιο τοξικό από τα βαρέα μέταλλα. Η συνεχιζόμενη χρήση του ως τρωκτικοκτόνου σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες και η αυξανόμενη χρήση του σε έναν αυξανόμενο αριθμό νέων τεχνολογιών εγείρουν ανησυχίες σχετικά με τον κίνδυνο έκθεσης σε ζώα και ανθρώπους.

Επειδή το Tl και το κάλιο (K) έχουν το ίδιο φορτίο και παρόμοιες ιοντικές ακτίνες, το Tl ακολουθεί τις οδούς διανομής K και μεταβάλλει και τον αριθμό K-εξαρτώμενων διεργασιών. Οι πιθανοί τοξικοί μηχανισμοί του Tl περιλαμβάνουν το σχηματισμό σύνδεσης με ομάδες σουλφυδρυλίου πρωτεΐνης, την αναστολή της κυτταρικής αναπνοής, την αλληλεπίδραση με συμπαράγοντες με ριβοφλαβίνη και τη διάσπαση της ομοιοστασίας ασβεστίου (Mulkey & Oehme, 1993).

Το γονίδιο PKLR κωδικοποιεί την πυροσταφυλική κινάση, που είναι το τελευταίο βήμα στο ήπαρ, κατά τη γλυκόλυση και την παραγωγή φωσφοενολοπυροσταφυλικού από πυροσταφυλικό και ATP. Βρίσκεται, κατά κόρον, σε αφθονία στο ήπαρ και η ανισορροπία του δημιουργεί προβλήματα στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Όμως, δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός που να έχει συσχετισθεί με διαταραχή γλυκόζης και ινσουλίνης. Επιπλέον, το γονίδιο της ATPase νατρίου-καλίου είναι το ATP1A1 το οποίο συμμετέχει στα μονοπάτια έκκρισης ινσουλίνης. Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός ή μετάλλαξη που έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη διατάραξη της έκκρισης ινσουλίνης ή στο διαβήτη τύπου 2.

Οι μεταλλοθειονεΐνες (MT) είναι χαμηλού μοριακού βάρους, μη ενζυματικές πρωτεΐνες πανταχού παρούσες στο ζωικό βασίλειο, και δη στα θηλαστικά. Οι MT περιέχουν 20 υπολείμματα κυστεΐνης τα οποία είναι κεντρικά στη σύνδεση με μέταλλα. Οι MT συντίθενται, κυρίως, στα ηπατοκύτταρα μετά την έκθεση σε βαρέα μέταλλα και η πιθανή βιολογική λειτουργία τους είναι να μεταβολίζουν και να εξουδετερώνουν τα βαρέα μέταλλα (Kilic et al., 2010). Μεταξύ των τεσσάρων γνωστών ισομορφών των MT, οι MT I και MT II έχουν μια μεγάλη παρουσία σε ιστούς με ιδιαίτερη αφθονία στο ήπαρ, το πάγκρεας, το έντερο και τους

νεφρούς. Η ισομορφή MT I φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την πρόληψη της κυτταρικής τοξικότητας από βαρέα μέταλλα (Kilic et al., 2010).

Η τοξικότητα Tl σχετίζεται στενά με αυξημένες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες με τη σειρά τους συνιστούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για βλάβη του ιστού και δυσλειτουργία. Η υπεροξειδωσις των λιπιδίων (LP) και η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) έχουν χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλοι δείκτες της τοξικότητας Tl για να τονίσουν τη συμμετοχή των ROS στο μηχανισμό και τη δράση τους (Kilic et al., 2010). Ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η μειωμένη γλουταθειόνη (GSH), και ενζυμικοί σαρωτές, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GSH-Px), αποτελούν αντιοξειδωτική άμυνα του συστήματος κατά της βλάβης των κυττάρων που προκαλείται από τις ROS (Galvan et al., 2005). Επίσης, η τοξικότητα Tl σχετίζεται στενά με τον αυξημένο σχηματισμό ROS (Galvan et al., 2005). Το Tl σχηματίζει προσδέματα με την πρωτεΐνη στις ομάδες σουλφυδρύλιου, αναστέλλοντας την κυτταρική αναπνοή, ενώ αλληλεπιδρά με τη ριβοφλαβίνη και συμπαραγοντες της ριβοφλαβίνης, διαταράσσοντας την ομοιόσταση του ασβεστίου. Επιπλέον, τα μονοσθενή ιόντα Tl είναι παρόμοια με το κάλιο στο ιοντικό του φορτίο και την ακτίνα κρυστάλλου, συνεπώς η τοξικότητά του μπορεί να αποδοθεί, εν μέρει, στην αλληλεπίδραση των διαύλων μεμβράνης και των μεταφορέων που συνδέονται με κάλιο (Galvan & Santamaria, 1998). Επίσης, οι τοξικές επιδράσεις του Tl⁺ σε ζωντανούς οργανισμούς οφείλονται στην ικανότητά του να διεισδύει εύκολα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IMM) (Saris et al 1981; Korotkov et al., 2008) και να αντικαθιστά το K⁺ στις βιοχημικές μεταφορές, διεργασίες ή πρωτεΐνες που περιέχουν κάλιο (Edelmann 1988; Douglas et al., 1990; Mulkey & Oehme, 1993).

Επιπροσθέτως, σε μια μελέτη (Lu et al., 2001) αποδείχθηκε ότι η αντικατάσταση του K⁺ με ένα άλλο ιόν διαπερατότητας (Tl⁺) μεταβάλλει δραματικά τη λειτουργία των καναλιών Kir2.1 και προς τις δύο κατευθύνσεις. Πρώτον, το Tl⁺ προκαλεί μια αργή απόσβεση του ρεύματος του ενός καναλιού, με αποτέλεσμα μια κυρίαρχη αγωγιμότητα και, δεύτερον, το Tl⁺ αποσταθεροποιεί σε μεγάλο βαθμό την ανοικτή κατάσταση του καναλιού και αλλάζει την ανοικτή/κλειστή κινητική του (Lu et al., 2001). Συνεπώς, πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο των kir2.1, που είναι το γονίδιο KCNJ2, θα μπορούσαν να επηρεάζουν μέσω του Tl την ινσουλίνη, ωστόσο οι γνωστοί πολυμορφισμοί και οι μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου συσχετίζονται με φαινοτύπους υψηλής κλινικής βαρύτητας (Παράρτημα Νο 1).

Πρωταρχικός προσδιοριστής της προστασίας MT έναντι του οξειδωτικού στρες θεωρείται ότι είναι η απελευθέρωση του απομονωμένου ψευδαργύρου από το MT και η επακόλουθη πρόσληψή του από μεμβράνες πλάσματος. Ο ψευδάργυρος σταθεροποιεί τις βιολογικές μεμβράνες και προστατεύει από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Kang, 1999).

Δεδομένου ότι το TI έχει υψηλή συγγένεια με -SH ομάδες, θα μπορούσε να αντιδράσει με την GSH, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματική συγκέντρωση GSH (Villaverde et al., 2004). Επίσης, το TI μπορεί να χηλικοποιηθεί από την ομάδα σελενόλης στην ενεργό θέση της GSH-Px ή από τα υπόλοιπα αμινοξέα κοντά στην καταλυτική θέση του ενζύμου. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί ενδοσυνδυασμού του Cu-Zn SOD μπορεί, επίσης, να είναι στόχοι, επειδή η ανεπάρκεια ινσουλίνης επιδρά θετικά στο K (υπερκαλιαιμία), και το αντίστροφο (Ferrannini et al., 1983), και, εφόσον το κάλιο και το θάλλιο είναι ανταγωνιστές, θεωρητικά η ανεπάρκεια ινσουλίνης επιδρά θετικά προς το TI, και αντίστροφα.

Τέλος, η μετάλλαξη L1544P στο γονίδιο KCNJ11 του υποδοχέα SUR1, μέρος της οκταμερούς δομής του παγκρεατικού καναλιού K⁺ (KATP), θα μπορούσε να επηρεάζεται από τη συγκέντρωση TI⁺, ωστόσο παρουσιάζει φαινότυπο με βαριά κλινική εικόνα (Korotkov et al., 2013).

1.4.7 Πρωτεΐνη C - αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)

Η πρωτεΐνη C-reactive (CRP) είναι μια δακτυλιοειδής πενταμερής πρωτεΐνη που βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται σε απόκριση φλεγμονής. Πρόκειται για πρωτεΐνη οξείας φάσης ηπατικής προέλευσης που αυξάνεται ύστερα από έκκριση ιντερλευκίνης-6 από μακροφάγα και T κύτταρα. Ο φυσιολογικός ρόλος της είναι να συνδέεται με τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, που εκφράζεται στην επιφάνεια των νεκρών κυττάρων (και ορισμένων τύπων βακτηρίων), προκειμένου να ενεργοποιήσει το σύστημα συμπληρώματος μέσω C1q (Thompson et al., 1999).

Η CRP συντίθεται από το ήπαρ ως απάντηση σε παράγοντες που απελευθερώνονται από μακροφάγα και λιπώδη κύτταρα. Είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών πεντραξίνης, ενώ δεν σχετίζεται με το C-πεπτίδιο (ινσουλίνη) ή την πρωτεΐνη C (πήξης αίματος). Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη ήταν ο πρώτος υποδοχέας αναγνώρισης προτύπου (PRR) που έχει ταυτοποιηθεί. Σε αρκετές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη CRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας μη

επεμβατικός δείκτης της NAFLD, καθώς βρέθηκε ότι είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας της NAFLD (Targher, 2006; Yoneda et al., 2007).

Το τελευταίο διάστημα κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος η άποψη ότι η φλεγμονή δεν είναι απλώς συνέπεια της στεάτωσης, αλλά μάλλον η αιτία της. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα του ήπατος (κύτταρα Kupffer) απαιτούνται για ηπατική στεάτωση σε ποντικούς που τρέφονται με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά (Huang et al., 2010; Molendi-Coste et al., 2010). Επιπλέον, σε ασθενείς με μεταβολική νόσο η φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να λειτουργήσει ως ενισχυτής της ηπατικής στεάτωσης, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου.

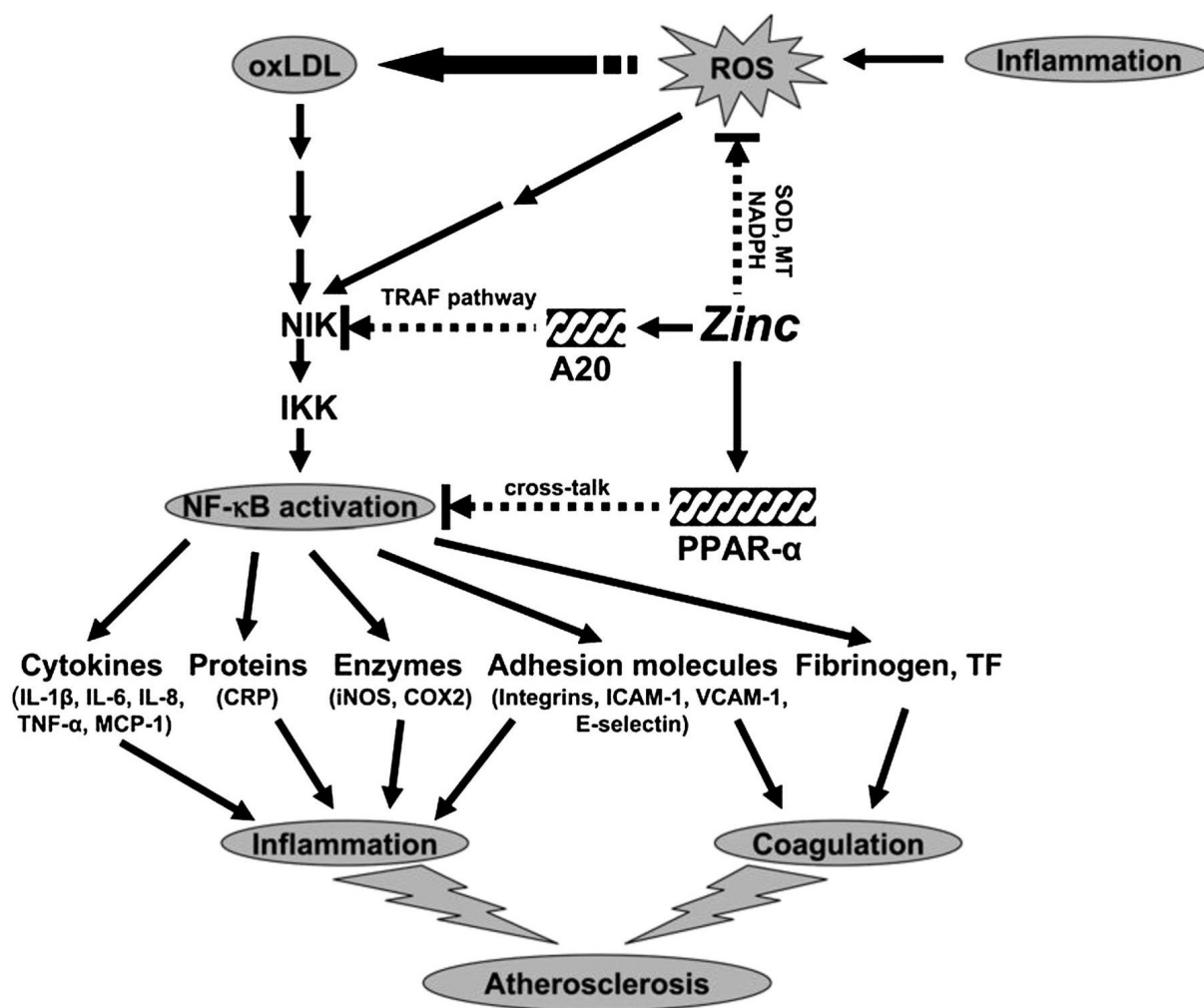
1.4.8 Επίπεδα ψευδαργύρου στο αίμα και συσχέτιση με CRP και φλεγμονή

Ο ψευδάργυρος στο ανθρώπινο σώμα ανιχνεύθηκε το 1963 και κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών υπήρξε μεγάλη πρόοδος στις κλινικές και βασικές επιστήμες σχετικά με το μεταβολισμό του. Ο κύριος διατροφικός παράγοντας που συμβάλλει στην ανεπάρκεια του ψευδαργύρου είναι η υψηλή πρόσληψη πρωτεϊνών από δημητριακά. Η κλινική ανεπάρκεια ψευδαργύρου έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με σύνδρομο δυσαπορρόφησης, ηπατική νόσο, χρόνια νεφρική νόσο, δρεπανοκυτταρική νόσο και άλλες χρόνιες ασθένειες.

Το οξειδωτικό στρες και η αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών έχουν εμπλακεί στην έναρξη και εξέλιξη πολλών χρόνιων παθήσεων, όπως την αθηροσκλήρωση, το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καθώς και ορισμένες κακοήθειες. Ο ψευδάργυρος δεν απαιτείται μόνο για την ανοσία που προκαλεί, είναι επίσης ένας αποτελεσματικός αντιοξειδωτικός και αντιφλεγμονώδης παράγοντας, καθώς και ένας αποτελεσματικός θεραπευτικός παράγοντας για τη διαχείριση μερικών από τις παραπάνω διαταραχές. Επίσης, ο ψευδάργυρος έχει μελετηθεί και υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι μπορεί να έχει προστατευτική δράση στην αθηροσκλήρωση, λόγω των αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών λειτουργιών του (Bao et al., 2010) (Σχήμα 6).

Σε μια προοπτική μελέτη με γυναίκες μεταξύ 33-60 ετών βρέθηκε μετά την προσαρμογή για μη διατροφικούς παράγοντες κινδύνου, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, του ΔΜΣ, του καπνίσματος και άλλων μεταβλητών, ότι τα υψηλότερα ποσοστά συνολικής όσο και διαιτητικής πρόσληψης ψευδαργύρου συσχετίστηκαν σημαντικά με έναν κατά 20% χαμηλότερο κίνδυνο διαβήτη τύπου 2 (Ananda et al., 2013). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα του

ψευδαργύρου στον ορό και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης σε δύο ομάδες ηλικιωμένων ασθενών σε νοσοκομείο. Τα επίπεδα CRP του ορού ήταν μεγαλύτερα από 10mg/l στο 62% της πρώτης ομάδας και στο 47% της δεύτερης, ενώ υπήρξε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ψευδαργύρου και της CRP και στις δύο ομάδες (Graig et al., 1990). Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου αυξάνει το οξειδωτικό στρες, ενώ η χρήση συμπληρωμάτων ψευδαργύρου μειώνει το οξειδωτικό στρες σε μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας, καθώς και σε ανθρώπους (Ananda et al., 2013).



Σχήμα 6. Οδός σηματοδότησης για την πρόληψη αθηροσκλήρωσης σε μονοκύτταρα/μακροφάγα και αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (Bao et al., 2010)

1.4.9 Ανάγκη για αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης γενετικών πολυμορφισμών και επιπέδων μετάλλων ως προς τη NAFLD και τις τιμές CRP

Είναι γεγονός πως έως τώρα λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει το ρόλο των επιπέδων μετάλλων στο αίμα σε συνδυασμό με τις αλληλεπιδράσεις με πολυμορφισμούς ως προς τη NAFLD και, επομένως, υπάρχει σχετική ένδειξη δεδομένων παγκόσμια, αλλά και στον ελληνικό χώρο. Δεδομένης της σημασίας και της λειτουργίας των μετάλλων στον οργανισμό, και ιδιαίτερα στο

ήπαρ, υπάρχει σημαντικό πεδίο μελέτης για την εύρεση συσχετίσεων των μετάλλων με τη νόσο. Επίσης, σημαντικός είναι και ο προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων των επιπέδων τους με γονίδια και πολυμορφισμούς ως προς την έκβαση της νόσου. Η αξιολόγηση, επίσης, της αλληλεπίδρασης μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών και των επιπέδων μετάλλων στο αίμα, και δη του Zn, ως προς την CRP σε ασθενείς με NAFLD είναι μεγάλης αξίας.

Είναι σημαντικό να γίνει πλήρως κατανοητό με ποιον τρόπο οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια και αλληλεπιδρούν με τα επίπεδα Zn, καθώς τροποποιούν τελικά τις τιμές της CRP. Η βαθύτερη γνώση των αλληλεπιδράσεων θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξατομίκευση και τη χρήση ή μη συμπληρωμάτων ψευδαργύρου σε ασθενείς με NAFLD, σχετικά με τη ρύθμιση των φλεγμονωδών διαδικασιών. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία για την αλληλεπίδραση μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών με το Zn σε ασθενείς με NAFLD περιλαμβάνει κάποιες μελέτες σε ανθρώπους, οι οποίες έχουν αναδείξει συσχετίσεις. Ωστόσο, η πλειονότητα των δεδομένων δεν έχει εντοπίσει τέτοιες συσχετίσεις στις τιμές του δείκτη φλεγμονής CRP.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αποτίμηση της επίδρασης των επιπέδων μετάλλων, καθώς και των αλληλεπιδράσεων των επιπέδων μετάλλων με γενετικούς πολυμορφισμούς, σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD) στην Ελλάδα. Στη συνέχεια, θα γίνει αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα επίπεδα μετάλλων ως προς τις τιμές CRP.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1.1 Σχεδιασμός

Η ελληνική NAFLD μελέτη είναι μια συγχρονική μελέτη ασθενών μαρτύρων, η οποία υλοποιήθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο) σε συνεργασία με το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

3.1.2 Συλλογή δείγματος

Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε από τη στρατολόγηση 351 ατόμων, τα οποία επισκέφθηκαν τα εξωτερικά ιατρεία της ηπατολογίας και της παχυσαρκίας του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό». Η συμμετοχή στη μελέτη ήταν εθελοντική και απαιτούσε την ενυπόγραφη συναίνεση των ατόμων. Η έγκριση για την πραγματοποίηση της μελέτης λήφθηκε από την Επιτροπή Ερευνών του Επιστημονικού Συμβουλίου του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό» και από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου.

3.1.3 Κριτήρια στρατολόγησης δείγματος

Τα αρχικά κριτήρια στρατολόγησης των ατόμων του δείγματος ήταν να είναι ενήλικες με ανώτατη ηλικία τα 65 έτη. Ο περαιτέρω διαχωρισμός του δείγματος σε άτομα που έπασχαν από NAFLD και σε υγιή άτομα πραγματοποιήθηκε έπειτα από τη διεξαγωγή υπερηχογραφήματος (US) άνω κοιλίας, το οποίο μη επεμβατικά κατέληγε στη διάγνωση της νόσου.

Κριτήρια αποκλεισμού των ατόμων με θετική διάγνωση:

- Τρέχουσα ή πρόσφατη συστηματική πρόσληψη αλκοόλ (>20gr/ημέρα για τις γυναίκες και >30gr/ημέρα για τους άνδρες).
- Ηπατίτιδα A, B, C, D και E, αυτο-άνοση ηπατική νόσος.
- Ηπατοτοξικά φάρμακα (αμιοδαρόνη, μεθοτρεξάτη, ισονιαζίδη, περεξιλίνη, κορτικοστεροειδή, οιστρογόνα).
- Μεταβολικές διαταραχές (έλλειψη α-1 αντιθρυψίνης, αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson).

3.1.4 Διαδικασία αξιολόγησης δείγματος

Η αξιολόγηση των ατόμων έγινε στα εργαστήρια του Διαβητολογικού Τμήματος της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής (ΑΠΠΚ) του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό».

Αιμοληψία/απομόνωση βιολογικών υλικών

Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε από ιατρό παθολόγο ύστερα από 12ωρη νηστεία. Τα δείγματα συλλέχθηκαν για βιοχημική και αιματολογική ανάλυση, καθώς και για γενετική ανάλυση.

Βιοχημική και αιματολογική ανάλυση

Η βιοχημική και αιματολογική ανάλυση των δειγμάτων αίματος έλαβε χώρα στα εργαστήρια του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό». Οι προς αξιολόγηση παράμετροι κατά τη βιοχημική ανάλυση των δειγμάτων ήταν τα επίπεδα σίδηρου, φερριτίνης, γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, HDL-c χοληστερόλης, LDL-c χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, ALT, AST, γ-GT, κρεατινίνης, αλβουμίνης, HbA1c, ινσουλίνης, CRP, ολικής χολερυθρίνης, νατρίου, καλίου, ουρικού οξέος και ουρίας.

3.1.5 Διάγνωση NAFLD

Ο διαχωρισμός του δείγματος σε ασθενείς NAFLD και μάρτυρες έγινε με υπερηχογράφημα άνω κοιλίας, το οποίο δίνει διάγνωση για λιπώδη νόσο του ήπατος βάσει κριτηρίων διάγνωσης. Σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια, τα άτομα κατηγοριοποιήθηκαν ως προς την ηπατική στεάτωση σε τέσσερις κατηγορίες:

- α. Απουσία στεάτωσης,
- β. ήπια στεάτωση,
- γ. μέτρια στεάτωση,
- δ. έντονη στεάτωση.

Σε επιπλέον ομαδοποίηση, τα άτομα με καθόλου ή ήπια ηπατική στεάτωση ονομάστηκαν μάρτυρες, εφόσον είχαν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, και τα άτομα με μέτρια ή έντονη ηπατική στεάτωση κατηγοριοποιήθηκαν ως ασθενείς, επειδή είχαν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Επιπλέον, έγινε κλινική αξιολόγηση για παρουσία χολολιθίασης και Debris, καθώς και εκτίμηση του μεγέθους του ήπατος.

Κριτήρια διάγνωσης ηπατικής στεάτωσης:

- Διάχυτη υπερηχογένεια ήπατος.
- Αυξημένη ηχογένεια ήπατος σε σύγκριση με ηχογένεια νεφρών.
- Ασαφopoίηση αγγειακών τοιχωμάτων.

Κατάταξη ως προς την ηπατική στεάτωση με βάση τα κριτήρια:

- 0: Φυσιολογική ηχογένεια.
- 1: Ελαφρά αυξημένη ηχογένεια με φυσιολογική απεικόνιση διαφράγματος και αγγείων.
- 2: Μέτρια αύξηση ηχογένειας με ελαφρά διαταραχή απεικόνισης διαφράγματος και αγγείων.
- 3: Μεγάλη αύξηση ηχογένειας με περιορισμένη απεικόνιση τοιχώματος αγγείων και διαφράγματος.

3.1.6 Γενετική ανάλυση

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

Απομόνωση λευκών αιμοσφαιρίων

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

Απομόνωση γενετικού υλικού

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

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος επιτρέπει τη γρήγορη και αυτοματοποιημένη απομόνωση gDNA από ανθρώπινο αίμα (ολικό αίμα, διαλύματα λευκών αιμοσφαιρίων). Η έκλυση του gDNA βασίζεται στη χρήση των μαγνητικών μικροσφαιριδίων Dynabeads MyOneTMSILANE. Το καθαρό gDNA που εκλύεται είναι κατάλληλο για εφαρμογές όπως η PCR, η γονοτύπηση και η ανάλυση του γονιδιώματος. Το αυτοματοποιημένο σύστημα εκχύλισης DNA iPrepTMPurification Instrument είναι ρομποτικό σύστημα έκλυσης νουκλεϊκών οξέων.

Χάρη στην ενσωματωμένη μαγνητική μονάδα και με τη χρήση τεχνολογίας μαγνητικών μικροσφαιριδίων υπάρχει δυνατότητα εκχύλισης 13 δειγμάτων ταυτόχρονα. Τα μικροσφαιρίδια Dynabeads MyOneTMSILANE είναι μαγνητικά σφαιρίδια (1 μ m) διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂) στην επιφάνεια των οποίων προσφύεται ειδικά το DNA. Η χρήση της τεχνολογίας των μικροσφαιριδίων για την έκλυση του gDNA δεν απαιτεί φυγοκέντρηση ή χρήση αντλίας κενού. Το προγραμματισμένο πρωτόκολλο, το οποίο βρίσκεται στην κάρτα iPrepTMCard:gDNA blood, είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο των παραμέτρων της μεθόδου, όπως ο όγκος των αντιδραστηρίων, τα βήματα ανάμειξης και οι χρόνοι επώασης.

Τεχνολογία μαγνητικών μικροσφαιριδίων

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

3.1.7 Ανάλυση πολυμορφισμών

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

3.1.8 Τελικός πίνακας επιλογής προς διερεύνηση SNPs

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα που αναφέρθηκαν στα κεφάλαια 1.3 και 1.4 καταλήγουμε σε μια λίστα για τους προς διερεύνηση πολυμορφισμούς. Στον Πίνακα 6 καταγράφονται τα γονίδια και οι πολυμορφισμοί, καθώς και τα μέταλλα που έχουν βιβλιογραφικά συνδεθεί με τις αναφερόμενες ασθένειες.

Πίνακας 6. Κατάλογος προς διερεύνηση γονιδίων-SNPs και μετάλλων που αλληλεπιδρούν και νόσοι με τις οποίες έχουν συνδεθεί

Μέταλλο που αλληλεπιδρά	Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Ασθένεια
Zn	SIRT1	rs7069102	Παχυσαρκία
Zn	SIRT1	rs11599176	Παχυσαρκία
Zn	SIRT1	rs3758391	Μεταβολικό σύνδρομο
Zn	SIRT2	rs10410544	Αλτσχάιμερ
Zn	SIRT2	rs10410544	Κατάθλιψη
Zn	SIRT2	rs10410544	Κατάθλιψη
Zn	SIRT2	rs892034	Παιδική παχυσαρκία
Zn	ZNF267	rs141138368	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
Zn	ADIPOQ	rs266729	Υποαδιπονεκτοναίμια
Zn	MTHFR	rs1801133	Ανεπάρκεια ψευδαργύρου
Zn	MTHFR	rs1801131	Ανεπάρκεια ψευδαργύρου
Zn	SOD1	rs2070424	Αντιεπιληπτικά-αντιηπατιτιδικά φάρμακα
Zn	CCL2	rs1024611	Στεάτωση σε ήπαρ
Zn	KLF6	rs3750861	Μη αλκοολική λιπώδης διήθηση
Zn	IL-6	rs1800795	
Zn	IL-6	rs11640851	Προστασία ήπατος
Zn	SLC30A8	rs11558471	Αποτελεσματική λήψη συμπληρώματος Zn
Zn	SLC30A8	rs13266634	Διαβήτης τύπου 2
Zn	PPAR-α	rs1800234	Στεάτωση σε ήπαρ
Zn	PPAR-γ	rs1801282	Μη αλκοολική λιπώδης διήθηση
Zn	SREBF1	rs2297508	Διαβήτης τύπου 2
Zn	SREBF1	rs11868035	Παχυσαρκία - Γαλλία
Zn	JAZF1	rs864745	Διαβήτης και HCC με παρουσία PNPLA3, Νόσος Crohn
Zn	SREBF1	rs2297508	Παχυσαρκία - Γαλλία
Cs	GRIK1	rs455804	Ηπατικός καρκίνος
Cs	ACY3	rs1000119125	Ηπατική νεοπλασία
Cs	ACY3	rs1000378689	Ηπατικός καρκίνος
Cs	VEGFC	rs17697419	Διαβήτης
Cs	VEGFC	rs2333526	Διαβήτης μη εξαρτώμενος από ινσουλίνη
Cs	MTHFD1	p.Asn439Lys	Παρεμποδίζουν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών δέσμευσης
Cs	MTHFD1	p.Asp445Asn	Παρεμποδίζουν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών δέσμευσης
Tl	MT1A	rs11076161	Διαβήτης μη εξαρτώμενος από ινσουλίνη
Tl	MT1A	rs8052394	Διαβήτης
Tl	INS	rs121918101	Υπερινσουλιναιμία
Tl	INS	rs28933985	Υπερινσουλιναιμία
Tl	INS	rs121908261	Διαβήτης ινσουλινोεξαρτώμενος
Tl	KCNJ11	rs5219	Διαβήτης τύπου 2

Ωστόσο, τα chip τα οποία χρησιμοποιήθηκαν με τα δεδομένα της μελέτης δεν περιλαμβάνουν όλους τους προτεινόμενους πολυμορφισμούς. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μηχανή <http://archive.broadinstitute.org/mpg/snap/ldsearch.php> στην οποία γίνεται αναζήτηση διαφορετικών πολυμορφισμών, αλλά πολύ κοντινών γενετικών τόπων σε αυτούς του Πίνακα 6.

Επειδή κάποια SPNs δεν υπήρχαν κατά την ανάλυση μικροσυστοιχιών της εργασίας, ο τελικός πίνακας των προς διερεύνηση πολυμορφισμών διαμορφώθηκε έπειτα από εύρεση των κοντινότερων σε αυτούς που απουσίαζαν και ήταν διαθέσιμοι (Παράρτημα Νο 2). Συγκεκριμένα, οι προστιθέμενοι πολυμορφισμοί ήταν:

- ✓ rs2833479
- ✓ rs459617
- ✓ rs991804
- ✓ rs1599823
- ✓ rs7190725
- ✓ rs11076160
- ✓ rs475106

Ο τελικός Πίνακας 7, περιλαμβάνοντας 16 πολυμορφισμούς, έχει ως εξής:

Πίνακας 7. Τελικός κατάλογος πολυμορφισμών προς διερεύνηση

Χρωμόσωμα	Γονίδιο	Πολυμορφισμός
1	MTHFR	rs1801133
3	PPARG	rs1801282
4	VEGFC	rs475106
7	JAZF1	rs864745
8	SLC30A8	rs13266634
8	SLC30A8	rs11558471
10	SIRT1	rs3758391
11	KCNJ11	rs5219
16	MT1A	rs11076160
16	MT1A	rs7190725
16	MT1A	rs1599823
17	SREBF1	rs11868035
17	CCL2	rs991804
21	GRIK1	rs459617
21	GRIK1	rs455804
21	SCAF4	rs2833479

3.1.9 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (PASW Statistics 18) και, συγκεκριμένα, για τους ελέγχους παραμετρικών και μη παραμετρικών τεστ, τα Chi Square test, t test και Mann-Whitney U test. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ SD), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτα και σχετικά ποσοστά. Η κανονική κατανομή των συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκε με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Η συχνότητα των μελετώμενων πολυμορφισμών στο δείγμα συγκρίθηκε με την αναμενόμενη συχνότητα, σύμφωνα με την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE).

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μελέτης του πληθυσμού σχετικά με τους πολυμορφισμούς και τη συσχέτιση με τις μετρήσεις μετάλλων πλάσματος χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο plink-1.07-dos. Για την ανάλυση συσχέτισης και αλληλεπίδρασης πολυμορφισμών με συνεχείς μεταβλητές εφαρμόστηκαν μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, ενώ για κατηγορικές χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα λογαριθμικής παλινδρόμησης. Η στατιστική σημαντικότητα στους ελέγχους εκτιμήθηκε σε επίπεδο 0.003 (0.05/16), εφόσον χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό όριο 0.05 διαιρούμενο με το πλήθος των προς ανάλυση πολυμορφισμών.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ερευνητικό δείγμα

Ο πληθυσμός των ατόμων με αναλύσεις σε μέταλλα ήταν 189, εκ των οποίων 113 γυναίκες και 76 άνδρες. Από αυτούς οι 119 ήταν ασθενείς και οι 70 υγιείς.

Πίνακας 8. Ποσοστό γυναικών και ανδρών ανά κατηγορία ασθενείς vs υγιείς

		Άνδρες	Γυναίκες	Σύνολο
		ς	ς	ο
Υγιείς	Αριθμός	27	43	70
	% ποσοστό	35,5	38,1	37,0
Ασθενείς	Αριθμός	49	70	119
	% ποσοστό	64,5	61,9	63,0
Σύνολο	Αριθμός	76	113	189
	% ποσοστό	100	100	100

Σχήμα 7. Ποσοστό γυναικών και ανδρών ανά κατηγορία ασθενείς vs υγιείς

4.2 Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Στον Πίνακα 9 αποτυπώνονται όλοι οι έλεγχοι για τις μεταβλητές: φύλο, σακχαρώδης διαβήτης, ηλικία, ΔΜΣ, Zn, Cs, Tl, ινσουλίνη, AST, ALT, γGT, NASH_Score, CRP (αντιδρώσα πρωτεΐνη), λεπτίνη. Επίσης, καταγράφονται οι έλεγχοι και των επιπέδων μετάλλων Zn, Cs, Tl στο πλάσμα με συγκεντρώσεις επάνω ή κάτω από 1171, 0.56 και 0.04, κατά αντιστοιχία σε ασθενείς-υγιείς.

Όπου οι μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, εφαρμόστηκε, όπως ήδη αναφέρθηκε, το Mann-Whitney U test. Σκοπός ήταν η σύγκριση των μέσων όρων των παραμέτρων μεταξύ των υγιών και των ασθενών, των οποίων τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα. Για τον υπολογισμό του p-value εφαρμόστηκε το Mann Whitney U test για τις μη-παραμετρικές μεταβλητές, ενώ για τις κατηγορικές (φύλο, διαβήτης, επίπεδα Zn, Cs, Tl επάνω ή κάτω από 1171, 0.56 και 0.04) εφαρμόστηκε ο έλεγχος Chi Square. Από τον παρακάτω Πίνακα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τιμές των δύο ομάδων, αφού σε όλες τις τιμές το p-value είναι μικρότερο του 0.05, εκτός από το φύλο, το επίπεδο Tl επάνω ή κάτω από 0,04μg/L, το AST και τη συγκέντρωση λεπτίνης. Επίσης, οι ασθενείς παρουσιάζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα (10,1%) σακχαρώδη διαβήτη από ό,τι οι υγιείς (0%). Αντίθετα, στη μεταβλητή φύλο δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ ανδρών-γυναικών σε ασθενείς και υγιείς.

Παρατηρούμε, επίσης, ότι σχετικά με τα μέταλλα ο Zn είναι σε ασθενείς ($1163,73 \pm 471,45$) χαμηλότερος με στατιστική σημαντικότητα από ό,τι στο γκρουπ υγιών ($1453,34 \pm 560,82$), ενώ στο Cs οι μέσοι όροι στο πλάσμα των ασθενών ($0,64 \pm 0,33$) είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότεροι από ό,τι στους υγιείς ($0,36 \pm 0,40$). Στις συγκεντρώσεις Tl στο πλάσμα δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών. Στις μεταβλητές ινσουλίνη και ηπατικά ένζυμα ALT, γGT οι ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές από ό,τι οι υγιείς με στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, στη συγκέντρωση λεπτίνης στο αίμα, αν και οι ασθενείς παρουσιάζουν υψηλότερη έναντι υγιών, δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα. Στην CRP υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο όρο των ασθενών ($2,78 \pm 4,56$) από τους υγιείς ($1,01 \pm 3,88$). Τέλος, βλέπουμε ότι σχετικά με το NASH_Score οι ασθενείς παρουσιάζουν υψηλότερο σκορ έναντι των υγιών. Σχετικά με την ηλικία, οι ασθενείς είναι ηλικιακά μεγαλύτεροι από ό,τι οι υγιείς και ο ΔΜΣ στους ασθενείς παρουσιάζει μεγαλύτερη μέση τιμή από ό,τι στους υγιείς, με στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 9. Τελικός κατάλογος ελέγχων μεταβλητών σε ασθενείς vs υγιείς

	(Ασθενείς) N=119	(Υγιείς) N=70	p-value
Φύλο (% άντρες)	49	27	0.760
ΔΜΣ	29,87 ± 4,61	23,81 ± 2,97	0.000
Σακχαρώδης διαβήτης (%)	10,1	0,0	0.006
Ηλικία (years)	50,48	36,54	0.001
Zn (μg/L)	1163,73 ± 471,45	1453,34 ± 560,82	0.000
Cs (μg/L)	0,64 ± 0,33	0,36 ± 0,40	0.000
Tl (μg/L)	0,041 ± 0,028	0,040 ± 0,027	0.826
Ινσουλίνη (uIU/mL)	15,06 ± 11,90	9,14 ± 3,00	0.000
AST(U/L)	21,90 ± 6,50	21,18 ± 5,38	0.436
ALT(U/L)	28,90 ± 14,51	20,69 ± 8,32	0.000
γGT(U/L)	28,33 ± 19,80	17,27 ± 15,50	0.000
NASH_Score	-1,40 ± 0,86	-1,80 ± 0,48	0.000
Λεπτίνη (ng/mL)	25,59 ± 30,14	19,06 ± 22,22	0.093
CRP (mg/L)	2,78 ± 4,56	1,01 ± 3,88	0.004
Zn(μg/L)	*Zn>1171 76	Zn<1171 (μg/L) 78	0.000
Cs(μg/L)	*Cs>0,56 79	Cs<0,56 (μg/L) 76	0.000
Tl(μg/L)	*Tl>0,04 62	Tl<0,04 (μg/L) 93	0.976

* Τα νούμερα αφορούν κατά αντιστοιχία τον πληθυσμό με συγκέντρωση μετάλλου στο πλάσμα > ή < από τα όρια 1171, 0.56 και 0.04 για τα μέταλλα Zn, Cs και Tl
 AST: Αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος
 ALT: Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης
 γGT: γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση
 NASH_Score: Σκορ μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, έχει αρνητικές τιμές, όσο μεγαλύτερη τιμή τόσο πιο προωθημένη νόσος

4.3 Έλεγχοι Πολυμορφισμών

Έγινε έλεγχος QC, ώστε να διερευνηθεί το ποσοστό εγγραφών που δεν τηρεί τα κριτήρια HWE (Hardy-Weinberg equilibrium), και ήταν μηδενικό.

Έγινε έλεγχος Call Rate ώστε να αφαιρεθούν όλες οι ελλιπείς εγγραφές με κωδικό -9. Έγινε έλεγχος συχνότητας (Freq) για την εύρεση της συχνότητας ελαχίστου αλληλίου MAF και προέκυψε ο Πίνακας 10.

Πίνακας 10. Αποτέλεσμα ελέγχου συχνότητας για εύρεση % ποσοστού MAF (ελαχίστου αλληλίου) στον πληθυσμό της μελέτης ελληνική NAFLD

Chromosome	SNPs	A1	MAF	% MAF
1	rs1801133	A	0.37530	37.5
3	rs1801282	G	0.07753	7.8
4	rs475106	A	0.07753	7.8
7	rs864745	A	0.49320	49.3
8	rs13266634	A	0.28540	28.5
8	rs11558471	G	0.29440	29.4
10	rs3758391	A	0.30450	30.5
11	rs5219	A	0.31910	31.9
16	rs11076160	A	0.23820	23.8
16	rs7190725	A	0.12700	12.7
16	rs1599823	A	0.32700	32.7
17	rs11868035	A	0.38310	38.3
17	rs991804	A	0.26290	26.3
21	rs459617	G	0.20680	20.7
21	rs455804	A	0.18760	18.8
21	rs2833479	G	0.05955	6.0

Όπου A1 ποσοστό ελαχίστου αλληλίου

Στον Πίνακα 11 ακολουθεί πολλαπλή λογαριθμική παλινδρόμηση για τη διερεύνηση και τον υπολογισμό της πιθανότητας ανάπτυξης μη-αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας, συγκριτικά με τη λίστα γονιδίων (Πίνακας 7).

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης για τη νόσο και η αλληλεπίδραση όλων των προτεινόμενων πολυμορφισμών με τη συγκέντρωση Zn στο αίμα, έπειτα από έλεγχο για ΔΜΣ, ηλικία και φύλο. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 11, δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός με στατιστικώς σημαντική διαφορά σχετικά με την αλληλεπίδρασή του με τις συγκεντρώσεις Zn στο αίμα και επίδραση στη νόσο.

Πίνακας 11. Αποτέλεσμα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης με χρήση συγχυτικών παραγόντων και διόρθωση για ΔΜΣ, ηλικία και φύλο για νόσο NAFLD σε σχέση με τη συγκέντρωση ψευδαργύρου στο αίμα και αλληλεπίδραση με τα 16 SNPs

CH R	SNP	BP	A 1	TEST	NMISS	OR	SE	L95	U95	STAT	P
1	rs1801133	11856378	A	ADDXZn	152	0.999 4	0.000722 7	0.998	1.001	- 0.79770	0.4251
3	rs1801282	12393125	G	ADDXZn	152	0.999 4	0.001386 0	0.996 7	1.002	- 0.44460	0.6566
4	rs475106	17765679 0	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.001431 0	0.997 4	1.003	0.16310	0.8705
7	rs864745	28180556	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.000673 3	0.998 7	1.001	- 0.02863	0.9772
8	rs13266634	11818478 3	A	ADDXZn	152	0.998 7	0.000875 0		1.000	- 1.51100	0.1309
8	rs11558471	11818573 3	G	ADDXZn	152	0.998 6	0.000877 6		1.000	- 1.58100	0.1139
10	rs3758391	69643342	A	ADDXZn	152	0.999 7	0.000709 0	0.998 3	1.001	- 0.46770	0.6400
11	rs5219	17409572	A	ADDXZn	152	0.999 1	0.000757 2	0.997 6	1.001	- 1.19300	0.2327
16	rs11076160	56673143	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.000832 9	0.999 4	1.003	1.28800	0.1978
16	rs7190725	56673290	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.000836 4	0.999 2	1.002	1.00900	0.3129
16	rs1599823	56675817	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.000614 8	0.999 2	1.002	0.68220	0.4951
17	rs11868035	17715101	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.000732 7	0.999	1.002	0.65880	0.5100
17	rs991804	32587725	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.000813 7	0.998 5	1.002	0.12500	0.9005
21	rs459617	31140753	G	ADDXZn	152	1.000 0	0.000705 6	0.998 7	1.002	0.16940	0.8655
21	rs455804	31146169	A	ADDXZn	152	1.000 0	0.000679 5	0.998 8	1.001	0.17070	0.8645
21	rs2833479	33051815	G	ADDXZn	152	1.001 0	0.001576 0	0.998 3	1.005	0.89940	0.3684

CHR: Χρωμόσωμα

SNP: Κωδικός πολυμορφισμού

BP: Σύγκριση δείκτη βάσης-ζεύγους

A1: Minor (σε ελάχιστη συχνότητα) αλληλίο

TEST: Τύπος ελέγχου

NMISS: Αριθμός μη απαγορευμένων γονοτύπων

OR : Λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων

SE: Τυπικό σφάλμα

Στον Πίνακα 12 ακολουθεί πολλαπλή λογαριθμική παλινδρόμηση για τη διερεύνηση και τον υπολογισμό της πιθανότητας ανάπτυξης μη-αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας συγκριτικά με τη λίστα γονιδίων (Πίνακας 7).

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης για τη νόσο και η αλληλεπίδραση όλων των προτεινόμενων πολυμορφισμών με τη συγκέντρωση Cs στο αίμα, έπειτα από έλεγχο για ΔΜΣ, ηλικία και φύλο. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 12, δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός με στατιστική σημαντικότητα σχετικά με την αλληλεπίδρασή του με τις συγκεντρώσεις Cs στο αίμα και επίδραση στη νόσο.

Πίνακας 12. Αποτέλεσμα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης με χρήση συγχυτικών παραγόντων και διόρθωση για ΔΜΣ, ηλικία και φύλο για νόσο NAFLD σε σχέση με τη συγκέντρωση καισίου στο αίμα και αλληλεπίδραση με τα 16 SNPs

CH R	SNP	BP	A 1	TEST	NMISS	OR	SE	L95	U95	STAT	P
1	rs1801133	11856378	A	ADDxCs	152	0.1272 0	1.285 0	0.01024 0	1.579	- 1.6050	0.1086
3	rs1801282	12393125	G	ADDxCs	152	0.7334 0	1.986 0	0.01497 0	35.940	- 0.1561	0.8759
4	rs475106	17765679 0	A	ADDxCs	152	0.8223 0	1.905 0	0.01965 0	34.420	- 0.1027	0.9182
7	rs864745	28180556	A	ADDxCs	152	1.1050 0	0.965 3	0.16660 0	7.328	0.1034	0.9176
8	rs13266634	11818478 3	A	ADDxCs	152	0.2353 0	1.160 0	0.02424 0	2.284	- 1.2480	0.2121
8	rs11558471	11818573 3	G	ADDxCs	152	0.2507 0	1.157 0	0.02594 0	2.423	- 1.1950	0.2320
10	rs3758391	69643342	A	ADDxCs	152	7.1290 0	1.256 0	0.60790 0	83.620	1.5640	0.1179
11	rs5219	17409572	A	ADDxCs	152	1.6550 0	1.110 0	0.18810 0	14.570	0.4542	0.6497
16	rs11076160	56673143	A	ADDxCs	152	2.6860 0	1.297 0	0.21130 0	34.140	0.7617	0.4462
16	rs7190725	56673290	A	ADDxCs	152	15.570 0	1.762 0	0.49230 0	492.10 0	1.558	0.1193
16	rs1599823	56675817	A	ADDxCs	152	1.4670 0	0.984 2	0.21320 0	10.100	0.3895	0.6969
17	rs11868035	17715101	A	ADDxCs	152	0.1122 0	1.125 0	0.01238 0	1.017	- 1.9450	0.0518
17	rs991804	32587725	A	ADDxCs	152	0.1108 0	1.315 0	0.00841 6	1.458	- 1.6730	0.09431
21	rs459617	31140753	G	ADDxCs	150	0.6618 0	1.288 0	0.05306 0	8.255	- 0.3206	0.7485
21	rs455804	31146169	A	ADDxCs	152	0.7757 0	1.215 0	0.07165 0	8.397	- 0.2090	0.8344
21	rs2833479	33051815	G	ADDxCs	152	0.0306 5	2.770 0	0.00013 4	6.983	- 1.2580	0.2083

CHR: Χρωμόσωμα

SNP: Κωδικός πολυμορφισμού

BP: Σύγκριση δείκτη βάσης-ζεύγους

A1: Minor (σε ελάχιστη συχνότητα) αλληλίο

TEST: Τύπος ελέγχου

NMISS: Αριθμός μη απαγορευμένων γονοτύπων

OR : Λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων

SE: Τυπικό σφάλμα

Στον Πίνακα 13 ακολουθεί πολλαπλή λογαριθμική παλινδρόμηση για τη διερεύνηση και τον υπολογισμό της πιθανότητας ανάπτυξης μη-αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας συγκριτικά με τη λίστα γονιδίων (Πίνακας 7).

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης για τη νόσο και η αλληλεπίδραση όλων των προτεινόμενων πολυμορφισμών με τη συγκέντρωση T1 στο αίμα, έπειτα από έλεγχο για ΔΜΣ, ηλικία και φύλο. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 13, δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός με στατιστικώς σημαντική διαφορά σχετικά με την αλληλεπίδρασή του με τις συγκεντρώσεις T1 στο αίμα και επίδραση στη νόσο.

Πίνακας 13. Αποτέλεσμα πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης με χρήση συγχυτικών παραγόντων και διόρθωση για ΔΜΣ, ηλικία και φύλο για νόσο NAFLD σε σχέση με τη συγκέντρωση θαλλίου στο αίμα και αλληλεπίδραση με τα 16 SNPs

CH R	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	OR	SE	L95	U95	STAT	P
1	rs1801133	11856378	A	ADDxT 1	152	1.73E-06	17.04	5.41E- 21	5.55E+0 8	-1.1840	0.23650
3	rs1801282	12393125	G	ADDxT 1	152	4.63E-28	35.50	2.82E- 58	0.7609	-1.9680	0.04911
4	rs475106	177656790	A	ADDxT 1	152	0.6178000	28.92	1.50E- 22	2.55E+2 7	-0.0167	0.98670
7	rs864745	28180556	A	ADDxT 1	152	0.0005776	13.80	1.03E- 12	3.25E+1 1	-0.5420	0.58910
8	rs13266634	118184783	A	ADDxT 1	152	2.25E+11	15.78	8.34E- 03	6.05E+2 4	1.2190	0.22290
8	rs11558471	118185733	G	ADDxT 1	152	1.57E+12	15.69	6.89E- 02	3.57E+2 5	1.3490	0.17730
10	rs3758391	69643342	A	ADDxT 1	152	0.2457000	17.83	1.64E- 13	3.68E+1 7	-0.0787	0.93720
11	rs5219	17409572	A	ADDxT 1	152	0.0001809	15.44	1.29E- 14	2.53E+1 2	-0.5580	0.57690
16	rs11076160	56673143	A	ADDxT 1	152	3.42E+08	17.66	3.15E- 07	3.72E+2 0	0.7214	0.47070
16	rs7190725	56673290	A	ADDxT 1	152	0.0251100	20.33	1.24E- 16	5.08E+1 8	-0.1812	0.85620
16	rs1599823	56675817	A	ADDxT 1	152	0.4247000	15.35	3.64E- 14	4.95E+1 5	-0.0558	0.95550
17	rs11868035	17715101	A	ADDxT 1	152	7.34E-09	18.17	2.53E- 27	2.13E+0 7	-1.4110	0.15810
17	rs991804	32587725	A	ADDxT 1	152	2.56E-03	17.33	4.51E- 18	1.45E+0 9	-0.7429	0.45750
21	rs459617	31140753	G	ADDxT 1	150	2.95E-03	17.51	3.66E- 18	2.38E+1 2	-0.7271	0.46710
21	rs455804	31146169	A	ADDxT 1	152	4.38E-07	17.52	5.35E- 22	3.58E+0 8	-1.2300	0.21870
21	rs2833479	33051815	G	ADDxT 1	152	0.3741000	22.45	2.93E- 17	4.79E+2 1	-0.0438	0.96510

CHR: Χρωμόσωμα

SNP: Κωδικός πολυμορφισμού

BP: Σύγκριση δείκτη βάσης-ζεύγους

A1: Minor (σε ελάχιστη συχνότητα) αλληλίο

TEST: Τύπος ελέγχου

NMISS: Αριθμός μη απαγορευμένων γονοτύπων

OR : Λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων

SE: Τυπικό σφάλμα

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης για την ύπαρξη νόσου, έπειτα από έλεγχο για τις τιμές ψευδαργύρου στο αίμα, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία και το φύλο. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι τιμές ψευδαργύρου στο αίμα δεν επηρεάζουν την ύπαρξη νόσου συγκριτικά με μη νόσο (ΣΛ: 0.999, ΔΕ: 0.998-1.000, p: 0.068). Επιπλέον, το φύλο δεν επηρεάζει τη νόσο (ΣΛ: 0.868, ΔΕ: 0.349-2.156, p: 0.76). Ωστόσο, καθοριστικό ρόλο, βάσει του συγκεκριμένου μοντέλου, φαίνεται ότι έχει η ηλικία (ΣΛ: 1.086, ΔΕ: 1.044-1.131, p: 0.000) και ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΛ: 1.458, ΔΕ: 1.255-1.693, p: 0.000).

Πίνακας 14. Μοντέλο πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης ασθενών-υγιών με έλεγχο για Zn, φύλο, ηλικία, ΔΜΣ

	ΣΛ	95% ΔΕ	p-value
Zn	0.999	0.998-1.000	0.068
Φύλο	0.868	0.349-2.156	0.760
Ηλικία	1.086	1.044-1.131	0.000
ΔΜΣ	1.458	1.255-1.693	0.000

ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης

ΣΛ: σχετικός λόγος

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης για την ύπαρξη νόσου, έπειτα από έλεγχο για τις τιμές καϊσίου στο αίμα, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία και το φύλο. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι τιμές καϊσίου στο αίμα επηρεάζουν τη NAFLD (ΣΛ: 1.441, ΔΕ: 1.245-1.667, p: 0.0008). Επιπλέον, δεν επηρεάζει τη νόσο το φύλο (ΣΛ: 1.206, ΔΕ: 0.478-3.042, p: 0.69). Ωστόσο, καθοριστικό ρόλο, βάσει του συγκεκριμένου μοντέλου, φαίνεται ότι έχει η ηλικία (ΣΛ: 1.081, ΔΕ: 1.038-1.126, p: 0.000) και ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΛ: 1.441, ΔΕ: 1.245-1.667, p: 0.000).

Πίνακας 15. Μοντέλο πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης ασθενών-υγιών με έλεγχο για Cs, φύλο, ηλικία, ΔΜΣ

	ΣΛ	95% ΔΕ	p-value
Cs	1.441	1.245-1.667	0.0008*
Φύλο	1.206	0.478-3.042	0.6920
Ηλικία	1.081	1.038-1.126	0.0000
ΔΜΣ	1.441	1.245-1.667	0.0000

*στατιστικά σημαντικό

ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης

ΣΛ: σχετικός λόγος

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης για την ύπαρξη νόσου, έπειτα από έλεγχο για τις τιμές θαλλίου στο αίμα, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία και το φύλο. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι τιμές Tl στο αίμα δεν επηρεάζουν την ύπαρξη NAFLD (ΣΛ: 113.521, ΔΕ: 0.000-1.783E9, p: 0.576). Επιπλέον, το φύλο δεν επηρεάζει τη νόσο (ΣΛ: 0.987, ΔΕ: 0.394-2.473, p: 0.977). Ωστόσο, καθοριστικό ρόλο, βάσει του συγκεκριμένου μοντέλου, φαίνεται ότι έχει η ηλικία (ΣΛ: 1.459, ΔΕ: 1.048-1.137, p: 0.000) και ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΛ: 1.459, ΔΕ: 1.260-1.690, p: 0.000).

Πίνακας 16. Μοντέλο πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης ασθενών-υγιών με έλεγχο για Tl, φύλο, ηλικία, ΔΜΣ

	ΣΛ	95% ΔΕ	p-value
Tl	113.521	0.000-1.783E9	0.576
Φύλο	0.987	0.394-2.473	0.977
Ηλικία	1.459	1.048-1.137	0.000
ΔΜΣ	1.459	1.260-1.690	0.000

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για τις συγκεντρώσεις Zn στο αίμα, έπειτα από έλεγχο για επίπεδα Cs, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία, το φύλο και τη νόσο. Φαίνεται ότι οι τιμές Zn στο αίμα επηρεάζονται από τις τιμές κασίου. Συγκεκριμένα, μια αύξηση των επιπέδων Cs στο αίμα συσχετίστηκε με μείωση των επιπέδων Zn στο αίμα (β : -202.978, ΔΕ: -405.293-(-)0.663, p: 0.049).

Πίνακας 17. Μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης επιπέδων Zn στο αίμα με έλεγχο για Cs, φύλο, ηλικία, ΔΜΣ, νόσο NAFLD

	β	95% ΔΕ	p-value
Cs	-202.978	-405.293-(-)0.663	0.049
Φύλο	-187.884	-340.861-(-)34.907	0.016
Ηλικία	1.263	-5.870-8.397	0.727
ΔΜΣ	-19.585	-2.103-0.037	0.037
Νόσος NAFLD	-139.527	-344.316-65.261	0.180

ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης

β : συντελεστής παλινδρόμησης

Επειδή η CRP δεν ακολουθεί κανονική κατανομή (Πίνακας 9), έγινε λογαρίθμηση των τιμών CRP και χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές LnCRP. Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για τις τιμές LnCRP στο αίμα, έπειτα από έλεγχο για τις τιμές Zn στο αίμα, το ΔΜΣ, την ηλικία, το φύλο και την ύπαρξη νόσου. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι τιμές ψευδαργύρου στο αίμα δεν επηρεάζουν τις τιμές της CRP, εφόσον δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα (β : 0.000, ΔΕ: -0.002-0.002, p: 0.803).

Πίνακας 18. Μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης τιμών Zn στο αίμα με έλεγχο για LnCRP, φύλο, ηλικία, ΔΜΣ, νόσο NAFLD

	β	95% ΔΕ	p-value
Zn	0.000	-0.004	0.803
Φύλο	0.572	-6.085	0.712
Ηλικία	0.039	-0.271	0.562
ΔΜΣ	0.042	-0.802	0.836
Νόσος NAFLD	0.910	-8.120	0.663

ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης

β : συντελεστής παλινδρόμησης

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης των 16 υπό μελέτη πολυμορφισμών στις τιμές LnCRP, έπειτα από έλεγχο για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ και νόσο NAFLD. Δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός ο οποίος να παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 19. Αποτέλεσμα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για συγκέντρωση τιμών LnCRP στο πλάσμα των 16 υπό μελέτη SNPs με χρήση συγχυτικών παραγόντων και διόρθωση για νόσο NAFLD, ηλικία, φύλο, ΔΜΣ

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMIS S	BETA	STAT	P
1	rs1801133	11856378	A	ADD	305	2.73000	1.42100	0.1562
3	rs1801282	12393125	G	ADD	305	-0.00475	- 0.00140	0.9989
4	rs475106	17765679 0	A	ADD	305	-3.83700	1.02900	0.3045
7	rs864745	28180556	A	ADD	305	-1.44200	- 0.75920	0.4484
8	rs13266634	11818478 3	A	ADD	305	-1.14500	- 0.53710	0.5916
8	rs11558471	11818573 3	G	ADD	305	-1.20400	- 0.57280	0.5672
10	rs3758391	69643342	A	ADD	305	1.31100	0.64670	0.5184
11	rs5219	17409572	A	ADD	305	1.06900	0.54650	0.5852
16	rs11076160	56673143	A	ADD	305	-0.96990	- 0.42710	0.6696
16	rs7190725	56673290	A	ADD	305	1.38800	0.47640	0.6341
16	rs1599823	56675817	A	ADD	305	-0.79440	- 0.38850	0.6979
17	rs11868035	17715101	A	ADD	305	-0.87830	- 0.45390	0.6503
17	rs991804	32587725	A	ADD	305	-1.91100	- 0.91560	0.3606
21	rs459617	31140753	G	ADD	305	-0.32170	- 0.14380	0.8858
21	rs455804	31146169	A	ADD	305	0.07837	0.03355	0.9733
21	rs2833479	33051815	G	ADD	305	-0.39290	-	0.9198

CHR: Χρωμόσωμα
 SNP: Κωδικός πολυμορφισμού
 BP: Σύγκριση δείκτη βάσης-ζεύγους
 A1: Minor (σε ελάχιστη συχνότητα) αλληλίο
 TEST: Τύπος ελέγχου
 NMISS: Αριθμός μη απαγορευμένων γονοτύπων
 Beta: Συντελεστής παλινδρόμησης
 STAT: Chi-square στατιστική
 P: Chi-square, p-value

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για CRP και αλληλεπίδραση πολυμορφισμών με Zn. Συγκεκριμένα, για το γονίδιο SLC30A8 ο πολυμορφισμός rs13266634 έχει $p=0.0008968$ με $\beta=0.002$ (Πίνακας 20). Επίσης, το rs11558471 του ίδιου γονιδίου έχει $p=0.001$ ($p<0.003$) με $\beta=0.001816$ (Πίνακας 20), ωστόσο ο έλεγχος δεν περιλαμβάνει ΔΜΣ. Η στατιστική σημαντικότητα χάνεται εάν προσθέσουμε στον έλεγχο μαζί με NAFLD, φύλο, ηλικία και το ΔΜΣ.

Επειδή η CRP δεν ακολουθεί κανονική κατανομή (Πίνακας 9), έγινε χρήση (Ln) τιμών της CRP, η οποία και επισυνάπτεται μαζί στον Πίνακα 20 με κόκκινα γράμματα. Επίσης, δεν ευρέθη στατιστική σημαντικότητα. Επιπλέον, έγινε αντίστοιχη διαδικασία μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης και για τα μέταλλα Cs και Tl με τις τιμές LnCRP, χωρίς στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Πίνακας 20. Αποτέλεσμα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση συγχυτικών παραγόντων και διόρθωση για νόσο NAFLD, ηλικία, φύλο, σχετικά με τη συγκέντρωση CRP στο πλάσμα και αποτέλεσμα rs13266634 για το αλληλίο A του SLC30A8 και rs11558471 για το αλληλίο G του SLC30A8. Επίσης και πίνακας με χρήση Ln της CRP

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	BETA	STAT	P*
8	rs13266634	11818478 3	A	ADDxZn	137	0.001877 0	3.400	0.00089 7
8	rs11558471	11818573 3	G	ADDxZn	137	0.001816 0	3.287	0.00130 4
CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	BETA	STAT	P
8	rs13266634	11818478 3	A	ADDxLnZ n	137	0.000162 8	3.196	0.00176 0
8	rs11558471	11818573 3	G	ADDxLnZ n	137	0.000157 8	3.097	0.00241 0

P*: Αν συμπεριληφθεί στον έλεγχο και ο ΔΜΣ, χάνεται η στατιστική σημαντικότητα

CHR: Χρωμόσωμα
 SNP: Κωδικός πολυμορφισμού
 BP: Σύγκριση δείκτη βάσης-ζεύγους
 A1: Minor (σε ελάχιστη συχνότητα) αλληλίο
 TEST: Τύπος ελέγχου
 NMISS: Αριθμός μη απαγορευμένων γονοτύπων

Beta: Συντελεστής παλινδρόμησης
STAT: Chi-square στατιστική
P: Chi-square, p-value

Στην παρούσα εργασία έγιναν και αρκετές δοκιμές εύρεσης συσχέτισης των επιπέδων μετάλλων Zn, Tl και Cs με τους πολυμορφισμούς, καθώς και διάφορους βιοχημικούς δείκτες, όπως ινσουλίνη και λεπτίνη. Επίσης, έγιναν δοκιμές αναφορικά με τη συσχέτιση των επιπέδων Zn στο αίμα με τους προς διερεύνηση πολυμορφισμούς και διάφορους βιοχημικούς δείκτες, πέραν της CRP, χωρίς να φτάσουν το όριο της στατιστικής σημαντικότητας, των οποίων η παρουσίαση των αποτελεσμάτων ξεφεύγει από το σκοπό της εργασίας.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) είναι μια διαταραχή της αποθήκευσης των ηπατικών λιπιδίων, που εκδηλώνεται είτε ως απλή στεάτωση είτε ως NASH (Non Alcoholic Steatohepatitis). Χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ηπατικού λίπους συνοδευόμενη από φλεγμονή, η οποία μπορεί να προχωρήσει, έπειτα από αρκετά χρόνια, σε πιο προηγμένη ηπατική νόσο.

Η νόσος είναι πλέον αποδεκτό ότι τις περισσότερες φορές συνυπάρχει με το μεταβολικό σύνδρομο και το διαβήτη τύπου 2, ενώ πλήθος μηχανισμών, όπως ο τραυματισμός ήπατος από τα τριγλυκερίδια, η συσσώρευση ηπατικού λίπους και το οξειδωτικό στρες, διαταράσσουν την ηπατική ομοιόσταση με αποτέλεσμα το φαινότυπο NAFLD.

Στην παρούσα εργασία έγινε, αρχικά, μια εκτενής βιβλιογραφική έρευνα για πιθανούς πολυμορφισμούς που μπορεί να αλληλεπιδρούν με τα επίπεδα μετάλλων (Zn, Tl, Cs), καθώς και επιδράσεις των επιπέδων μετάλλων στην έκβαση της NAFLD. Έπειτα, επικεντρωθήκαμε σε πιθανή επίδραση στη CRP αντιδρώσα πρωτεΐνη, δεδομένου ότι αποτελεί έναν κοινό δείκτη φλεγμονής και υπάρχουν στοιχεία συσχέτισης με τα επίπεδα Zn στο αίμα.

Συγκεκριμένα, για το δείγμα φάνηκε ότι στις τιμές της CRP υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο όρο των ασθενών από τους υγιείς εθελοντές. Επίσης, φάνηκε ότι σχετικά με το NASH_Score, την ηλικία και το ΔΜΣ οι ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλύτερη μέση τιμή από ό,τι οι υγιείς, με στατιστική σημαντικότητα. Σχετικά με τα μέταλλα, ο Zn είναι, με στατιστική σημαντικότητα, χαμηλότερος στους ασθενείς από ό,τι στο γκρουπ ελέγχου, ενώ στο Cs οι μέσοι όροι στο πλάσμα των ασθενών είναι στατιστικώς σημαντικά υψηλότεροι από ό,τι στους υγιείς. Το ίδιο ισχύει και στις μεταβλητές της ινσουλίνης και των ηπατικών ενζύμων ALT, γGT.

Καθοριστικό ρόλο στη NAFLD φαίνεται ότι έχει η ηλικία (ΣΛ: 1.086, ΔΕ: 1.044-1.131, p: 0.000) και ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΛ: 1.458, ΔΕ: 1.255-1.693, p: 0.000). Επίσης, αναγνωρίστηκε ότι από τα τρία προς διερεύνηση μέταλλα Zn, Cs, Tl κανένα δεν είχε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σχετικά με την αλληλεπίδραση με κάποιον από τους 16 προς μελέτη πολυμορφισμούς ως προς την επίδραση στη νόσο NAFLD. Ωστόσο, έπειτα από χρήση μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης, φάνηκε ότι οι τιμές Cs στο αίμα επιδρούν στην έκβαση

της νόσου NAFLD και, συγκεκριμένα, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ τιμών συγκεντρώσεως Cs και νόσου (ΣΛ: 1.441, ΔΕ: 1.245-1.667, p : 0.0008).

Σε μια άλλη μελέτη (Lin et al., 2017) τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι η υψηλότερη έκθεση σε βαρέα μέταλλα του εδάφους συσχετίστηκε με μεγαλύτερη διαταραχή λιπιδίων στους άνδρες. Ο κίνδυνος ήταν υψηλότερος στους άνδρες με ΔΜΣ <24. Μεταξύ των βαρέων μετάλλων τα Cr, Ni και Cu συσχετίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με τη NAFLD. Επίσης, σε μια επιπλέον μελέτη υπήρχε ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μολύβδου (Pb) στο αίμα με τον αυξημένο κίνδυνο για NAFLD (Zhai et al., 2017). Οι μη ραδιενεργές ενώσεις του κασίου είναι ήπια τοξικές και το μη ραδιενεργό Cs δεν αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό κίνδυνο. Λόγω μεγάλης χημικής συνάφειας με το κάλιο, οι βιοχημικές διεργασίες μπορεί να συγχέονται και να έχουμε υποκατάσταση του καλίου με το καίσιο στο σώμα, οδηγώντας σε υποκαλιαιμία (Melnikov et al., 2010). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι το χαμηλό επίπεδο καλίου στον ορό σχετίζεται με τη NAFLD και άλλες μεταβολικές διαταραχές (Sun et al., 2013). Συνεπώς, ένας πιθανός μηχανισμός προώθησης της NAFLD και της συσχέτισης με τις συγκεντρώσεις Cs στο αίμα μπορεί να είναι και ο έμμεσος «εκτοπισμός» του καλίου από βιοχημικές διεργασίες. Επιπλέον, φάνηκε ότι οι τιμές Zn στο αίμα επηρεάζονται από τις τιμές κασίου και, συγκεκριμένα, μια αύξηση των επιπέδων Cs στο αίμα συσχετίστηκε με μείωση των επιπέδων Zn (β : -202.978, ΔΕ: -405.293-(-)0.663, p : 0.049). Αυτό, ενδεχομένως, μπορεί να είναι ένα δεύτερο στοιχείο που εξηγεί την αρνητική συσχέτιση επιπέδων Cs και NAFLD, δεδομένου ότι είναι πλέον αποδεκτό ότι τα χαμηλά επίπεδα Zn επιδρούν αρνητικά στο ήπαρ προωθώντας τη στεάτωση.

Η ιδέα της αλληλεπίδρασης μετάλλων και ιχνοστοιχείων στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι καινούρια. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη που έγινε σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση συγκριτικά με υγιείς (Ilyas & Shah, 2016) φάνηκε ότι τα μέταλλα έχουν αντίστροφες σχέσεις που εκδηλώνονται με σημαντικά αρνητικές συσχετίσεις. Για παράδειγμα, τα ζεύγη Cd-Pb ($r=-0,47$) και Co-Pb ($r=-0,31$) δείχνουν την εξάντληση ή τον εμπλουτισμό συγκεκριμένων μετάλλων με κόστος σε άλλα, ενώ, εν τέλει, τα περισσότερα από τα βασικά μέταλλα αποκάλυψαν ισχυρές αμοιβαίες συσχετίσεις στο αίμα του γκρουπ των υγιών, π.χ. Fe-Zn ($r=0,64$).

Επιπλέον, φαίνεται ότι οι τιμές ψευδαργύρου στο αίμα δεν επηρεάζουν τις τιμές της CRP στο συγκεκριμένο μοντέλο, εφόσον δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα (β : 0.000, ΔΕ: -0.002-0.002, p : 0.803). Επίσης, τα αποτελέσματα ελέγχου πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης των

16 υπό μελέτη πολυμορφισμών στις τιμές LnCRP, έπειτα από έλεγχο για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ και νόσο NAFLD, δεν είχαν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Οι γενετικοί παράγοντες, βιβλιογραφικά, φαίνεται ότι συμβάλλουν καθοριστικά στην εξέλιξη της νόσου. Συγκεκριμένα, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ επιπέδων μετάλλων στο αίμα και διαφόρων πολυμορφισμών. Αρκετοί πολυμορφισμοί επηρεάζουν τα επίπεδα μετάλλων στο αίμα, όπως στη μελέτη Kayaal et al. (2011), όπου τα άτομα με το γονότυπο GG στο γονίδιο MT2A είχαν στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα Zn και υψηλότερα επίπεδα Cd και Pb στα δείγματα αίματος, σε σχέση με τα άτομα με γονότυπους AA και AG.

Ορισμένα μέταλλα, και συγκεκριμένα ο Zn, είναι απαραίτητα για την κανονική ηπατική λειτουργία, ενώ ταυτόχρονα το ήπαρ έχει κεντρικό ρόλο στην ομοιόσταση του Zn. Κατά συνέπεια, οι ασθένειες του ήπατος επηρεάζουν τα επίπεδα Zn, ενώ η ανεπάρκεια Zn μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεσή τους.

Ψευδαργυρική ανεπάρκεια προκαλεί οξειδωτικό στρες (Powell, 2000), καθώς και συνθήκες που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, όπως ευπάθεια σε ηπατίτιδα, απώλεια της ανταπόκρισης έναντι της ηπατίτιδας και οξείδωση των λιπιδίων (DiSilvestro, 2000; Parsons et al., 1994). Η ανεπάρκεια Zn μεταβάλλει την κυτταρική οξειδωτική κατάσταση, ενώ επιπλέον οδηγεί και σε ίνωση ήπατος (Prasad et al., 1994). Επίσης, μειωμένα ηπατικά επίπεδα Zn έχουν συσχετισθεί με μειωμένη ηπατική λειτουργία και αναγέννηση (Grungreiff, 2002).

Το οξειδωτικό στρες και η αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών έχουν εμπλακεί στην έναρξη και εξέλιξη πολλών παθήσεων, όπως αθηροσκλήρωση, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και ορισμένες κακοήθειες. Ο ψευδάργυρος ως συμπλήρωμα είναι αποτελεσματικός θεραπευτικός παράγοντας για τη διαχείριση μερικών από αυτές τις διαταραχές. Όπως ειπώθηκε, η ανεπάρκεια ψευδαργύρου αυξάνει το οξειδωτικό στρες, ενώ η χρήση συμπληρωμάτων ψευδαργύρου μειώνει το οξειδωτικό στρες σε μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας, καθώς και σε ανθρώπους (Ananda et al., 2013). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα του ψευδαργύρου στον ορό, καθώς και δείκτες φλεγμονής, όπως C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, σε δύο ομάδες ηλικιωμένων ασθενών σε νοσοκομείο. Υπήρξε στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ψευδαργύρου και της CRP και στις δύο ομάδες (Graig et al., 1990). Συνεπώς, φαίνεται ότι αποτελεί ένα θέμα προς μελέτη

η αλληλεπίδραση πολυμορφισμών γονιδίων με τα επίπεδα ψευδαργύρου στο αίμα, καθώς και η επίδραση που έχουν στις τιμές του δείκτη φλεγμονής CRP.

Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η διερεύνηση πολυμορφισμών του SLC30A8 με τα επίπεδα ψευδαργύρου ορού αναφορικά με την CRP, επειδή το συγκεκριμένο γονίδιο διευκολύνει τη συσσώρευση ψευδαργύρου από το κυτταρόπλασμα σε ενδοκυτταρικά κυστίδια, που είναι μεταφορέας εκροής ψευδαργύρου. Τα ευρήματα μελετών υποστηρίζουν στοιχεία για τη συσχέτιση υψηλότερης συνολικής πρόσληψης ψευδαργύρου με χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας. Επιπλέον, το rs13266634 είναι ένας από τους πιο σταθερά αναπαραγόμενους πολυμορφισμούς κινδύνου για διαβήτη (Cauchi et al., 2010).

Στην παρούσα μελέτη, στην περίπτωση της αντιδρώσας πρωτεΐνης CRP, έγινε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για CRP και αλληλεπίδραση με Zn. Το rs13266634 του γονιδίου SLC30A8 έδειξε $p=0.002$ με $\beta=0.0002$, έπειτα από έλεγχο για ηλικία, φύλο και νόσο. Ωστόσο όταν στον έλεγχο συμπεριλαμβάνεται και ο ΔΜΣ χάνεται η στατιστική σημαντικότητα. Επίσης, ακριβώς το ίδιο ισχύει και για το rs11558471 του γονιδίου SLC30A8 που έχει $p=0.002$ ($p<0.003$) με $\beta=0.0002$ (Πίνακας 15), προ ελέγχου με ΔΜΣ.

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) είναι πρωτεΐνη του αίματος, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται γρήγορα σε απόκριση φλεγμονής. Ο ρόλος της είναι να συνδέεται με τη φωσφοχολίνη, μία πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια νεκρών κυττάρων και βακτηρίων.

Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι πειραματικά σε μια μελέτη σε παιδιά από τη Λατινική Αμερική δεν αποδείχθηκε απευθείας σχέση στις τιμές Zn ορού και στη CRP (Bui et al., 2012), ωστόσο σε μια άλλη υπήρχε σαφής σύνδεση χαμηλού Zn ορού και αυξημένης CRP (De paula et al., 2014). Σε μια άλλη, επίσης, μελέτη σε γυναικείο πληθυσμό (Jung et al., 2015) φαίνεται ότι υπάρχει θετική επίδραση χορήγησης συμπληρώματος Zn στη μείωση της CRP.

Περιορισμοί στην έρευνα υπάρχουν λόγω μικρού δείγματος, καθώς ένα μεγαλύτερο δείγμα θα έδινε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα και με μεγαλύτερη βαρύτητα. Επίσης, ενδεχομένως, θα μπορούσε να πιαστεί το όριο της στατιστικής σημαντικότητας. Επιπλέον, ένας δεύτερος περιορισμός είναι ότι η έρευνα δεν ήταν προοπτική, ώστε να παρακολουθηθεί η εξέλιξη της

νόσου στα άτομα αυτά. Τέλος, δεν υπήρχε διαβάθμιση της νόσου NAFLD βάσει των επιπέδων CRP, ινσουλίνης και λεπτίνης, κάτι που θα ήταν υποβοηθητικό.

Συμπερασματικά, στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός, από τους 16, που αλληλεπιδρά με τα επίπεδα μετάλλων Zn, Cs και Tl στο αίμα ως προς την έκβαση της NAFLD. Στο γκρουπ των ασθενών τα επίπεδα Cs στο αίμα είναι υψηλότερα από ό,τι στους υγιείς, με στατιστική σημαντικότητα. Τα αποτελέσματα του μοντέλου πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης για την ύπαρξη νόσου, έπειτα από έλεγχο για τις τιμές καϊσίου στο αίμα, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία και το φύλο, έδειξαν στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι τιμές καϊσίου στο αίμα επηρεάζουν την ύπαρξη νόσου (ΣΛ: 1.441, ΔΕ: 1.245-1.667, p : 0.0008), έπειτα από έλεγχο για φύλο, ΔΜΣ και ηλικία. Επίσης, οι τιμές Zn στο αίμα επηρεάζονται από τις τιμές καϊσίου και, συγκεκριμένα, μια αύξηση των επιπέδων Cs στο αίμα συσχετίστηκε με μείωση των επιπέδων Zn στο αίμα (β : -202.978, ΔΕ: -405.293-(-)0.663, p : 0.0.49), έπειτα από έλεγχο για φύλο, ΔΜΣ και ηλικία. Ενδεχομένως, σε μια μελλοντική εργασία θα μπορούσε να αξιολογηθεί η σχέση του Cs με τη μεταβλητή HOMA-IR (ομοιοστατική αξιολόγηση μοντέλου για την αντίσταση στην ινσουλίνη), καθώς και τα επίπεδα ινσουλίνης και αυτό διότι τα χαμηλά επίπεδα καλίου ορού έχουν συνδεθεί με μεταβολικές δυσλειτουργίες (Sun et al., 2013) και αντίσταση στην ινσουλίνη.

Αν και στο γκρουπ ασθενών οι τιμές CRP και επίπεδων Zn είναι στατιστικά υψηλότερες, συγκριτικά με το γκρουπ ελέγχου, δεν καταλήξαμε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ότι οι πολυμορφισμοί rs13266634 και rs11558471 του γονιδίου SLC30A8 αλληλεπιδρούν με τις τιμές Zn στο αίμα και, εν τέλει, στα επίπεδα της CRP. Πρέπει να καταγραφεί, ωστόσο, ότι, αν στον έλεγχο δεν συμπεριληφθεί ο ΔΜΣ και μείνουν μόνο το φύλο, η ηλικία και η νόσος, οι δύο πολυμορφισμοί «πιάνουν» το όριο της στατιστικής σημαντικότητας. Θεωρητικά, σε ένα μεγαλύτερο δείγμα ίσως μπορεί να αποδειχθεί ότι από το γονίδιο SLC30A8 εμπλέκονται και οι δύο συγκεκριμένοι minor πολυμορφισμοί G και A των rs11558471 και rs13266634 στην αύξηση της CRP, όταν αυξάνει η ποσότητα Zn. Επίσης, το MAF% του πολυμορφισμού rs13266634 σε άλλες μελέτες, όπως τη φιλανδική (Vangipurapu et al., 2011), είναι 39,3%, ενώ στη συγκεκριμένη μελέτη είναι 28,5%, κάτι που μπορεί επίσης, σε συνδυασμό με το μέγεθος του δείγματος, να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Επίσης, υπάρχουν πεδία περαιτέρω έρευνας σχετικά με δεδομένα της ανάλυσης που έδωσαν αποτελέσματα <0.05 , ανεξαρτήτως εάν δεν έπιασαν το όριο του 0.003, και τα οποία δεν καταγράφονται στην παρούσα εργασία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Powell SR (2000), *The antioxidant properties of zinc*. J Nutr 130:1447S–1454S.
2. DiSilvestro RA (2000), *Zinc in relation to diabetes and oxidative disease*. J Nutr 130:1509S–1511S.
3. Parsons SE, DiSilvestro RA (1994), *Effects of mild zinc deficiency, plus or minus an acute-phase response, on galactosamine-induced hepatitis in rats*. Br J Nutr 72:611–618.
4. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH (2004), *Antioxidant effect of zinc in humans*. Free Radic Biol Med 37:1182–1190.
5. Krebs NE, Hambidge KM (2001), *Zinc metabolism and homeostasis: the application of tracer techniques to human zinc physiology*. Biometals 14:397–412.
6. Maret W (2003), *Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair*. J Nutr 133:1460S–1462S.
7. Theocharis SE, Margeli AP, Koutselinis A (2003), *Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer*. Int J Biol Markers 18:162–169.
8. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP (2004), *Metallothionein expression in human neoplasia*. Histopathology 45:103–118.
9. Henkel G, Krebs B (2004), *Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury, and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features—structural aspects and biological implications*. Chem Rev 104:801–824.
10. Andrews GK (2001), *Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression*. Biometals 14:223–237.
11. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD (2001), *The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death*. Biometals 14:315–330.
12. Truong-Tran AQ, Grosser D, Ruffin RE, Murgia C, Zalewski PD (2003), *Apoptosis in the normal and inflamed airway epithelium: role of zinc in epithelial protection and procaspase-3 regulation*. Biochem Pharmacol 66:1459–1468.
13. Eide DJ (2003), *Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in Saccharomyces cerevisiae*. J Nutr 133:1532S–1535S.
14. Grungreiff K (2002), *Zinc in liver disease*. J Trace Elem Exp Med 15:67–78.
15. Xu Z, Squires EJ, Bray TM (1994), *Effects of dietary zinc deficiency on the hepatic microsomal cytochrome P450 2B in rats*. Can J Physiol Pharmacol 72:211–216.

16. Camps J, Bargallo T, Gimenez A, Alie S, Caballeria J, Pares A, Joven J, Masana L, Rodes J (1992), *Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloridetreated rats: effect of zinc administration*. Clin Sci (Lond) 83:695–700.
17. Kojima-Yuasa A, Ohkita T, Yukami K, Ichikawa H, Takami N, Nakatani T, Opare Kennedy D, Nishiguchi S, Matsui-Yuasa I (2003), *Involvement of intracellular glutathione in zinc deficiency induced activation of hepatic stellate cells*. Chem Biol Interact 146:89–99.
18. Dashti HM, Mathew TC, Jadaon MM, Ashkanani E (1997), *Zinc and liver cirrhosis: biochemical and histopathologic assessment*. Nutrition 13:206–212.
19. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A (1995), *Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats*. Hepatology 21:787–795.
20. Cabre M, Ferre N, Folch J, Paternain JL, Hernandez M, del Castillo D, Joven J, Camps J (1999), *Inhibition of hepatic cell nuclear DNA fragmentation by zinc in carbon tetrachloride-treated rats*. J Hepatol 31:228–234.
21. Camps J, Bargallo T, Gimenez A, Alie S, Caballeria J, Pares A, Joven J, Masana L, Rodes J (1992), *Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloridetreated rats: effect of zinc administration*. Clin Sci (Lond) 83:695–700.
22. Anttinen H, Ryhanen L, Puistola U, Arranto A, Oikarinen A (1984), *Decrease in liver collagen accumulation in carbon tetrachloride-injured and normal growing rats upon administration of zinc*. Gastroenterology 86:532–539.
23. Gimenez A, Pares A, Alie S, Camps J, Deulofeu R, Caballeria J, Rodes J (1994), *Fibrogenic and collagenolytic activity in carbon-tetrachloride-injured rats: beneficial effects of zinc administration*. J Hepatol 21:292–298.
24. Kojima-Yuasa A, Ohkita T, Yukami K, Ichikawa H, Takami N, Nakatani T, Opare Kennedy D, Nishiguchi S, Matsui-Yuasa I (2003), *Involvement of intracellular glutathione in zinc deficiency induced activation of hepatic stellate cells*. Chem Biol Interact 146:89–99.
25. Loguercio C, De Girolamo V, Federico A, Feng SL, Crafa E, Cataldi V, Gialanella G, Moro R, Del Vecchio Blanco C (2001), *Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease*. Biol Trace Elem Res 81:245–254.
26. Cabre M, Camps J, Paternain JL, Ferre N, Joven J (2000), *Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis*. Clin Exp Pharmacol Physiol 27:694– 699.

27. Sullivan JF, Jetton MM, Hahn HK, Burch RE (1980), *Enhanced lipid peroxidation in liver microsomes of zinc-deficient rats*. Am J Clin Nutr 33:51–56.
28. DiSilvestro RA, Carlson GP (1994), *Effects of mild zinc deficiency, plus or minus acute phase response, on CCl₄ hepatotoxicity*. Free Radic Biol Med 16:57–61.
29. Chvapil M, Ryan JN, Elias SL, Peng YM (1973), *Protective effect of zinc on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats*. Exp Mol Pathol 19:186–196.
30. Ferre N, Girona J, Cabre M, Joven J, LaVille A, Masana L, Paternain JL, Camps J (1999), *Hepatic production of apolar aldehydes in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis*. Mol Cell Biochem 198:57–60.
31. Zhou Z, Sun X, Lambert JC, Saari JT, Kang YJ (2002), *Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury*. Am J Pathol 160:2267–2274.
32. Abul HT, Mathew TC, Abul F, Al-Sayer H, Dashti HM (2002), *Antioxidant enzyme level in the testes of cirrhotic rats*. Nutrition 18:56–59.
33. Lee JY, Kim KM, Lee SG, Yu E, Lim YS, Lee HC et al. (2007), *Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center*, J. Hepatol. 47 239–244.
34. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC et al. (2004), *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*, Hepatology 40 1387–1395.
35. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F et al. (2000), *Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy*, Ann. Intern. Med. 132 112–117.
36. Bugianesi E, Leone N, Vani E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P et al. (2002), *Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma*, Gastroenterology 123 134–140.
37. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K et al. (2012), *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guidelines by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association*, Hepatology 55 2005–2023.
38. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM (2011), *Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver diseases and non-alcoholic steatohepatitis in adults*, Aliment. Pharmacol. Ther. 34 274–285.

39. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S et al. (2005), *Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms*, Diabetologia 48 634–642.
40. Hofer H, Bankl HC, Wrba F, Steindl-Munda P, Peck-Radosavljevic M, Österreicher C et al. (2002), *Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a*, Am. J. Gastroenterol. 97 2880–2885.
41. Grieco A, Forgione A, Miele L, Vero V, Greco AV, Gasbarrini A et al. (2005), *Fatty liver and drugs*, Eur. Rev. Med. Pharm. Sci. 9 261–263.
42. Stättermayer AF, Traussnigg S, Dienes HP, Aigner E, Stauber R, Lackner K et al. (2015), *Hepatic steatosis in Wilson disease –role of copper and PNPLA3 mutations*, J. Hepatol. 63 156–163.
43. Romeo S, Kotzlina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennachio LA et al. (2008), *Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*, Nat. Genet. 40 1461–1465.
44. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto Hl (2006), *Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery*, J. Hepatol. 45 600–606.
45. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G et al. (2000), *Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients*, Dig. Dis. Sci. 45 1929–1934.
46. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Mogueira CA, Cardoso CR (2009), *Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus*, Liver Int. 57 205–210.
47. Wong VW, Wong GL, Yeung DK, Lau TK, Chan CK, Chim AM et al. (2015), *Incidence of non-alcoholic fatty liver disease in Hong Kong: a population study with paired proton-magnetic resonance spectroscopy*, J. Hepatol. 62 182–189.
48. Yuan X, Waterworth D, Perry JR, Lim N, Song K, Chambers JC et al. (2008), *Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes*, Am. J. Hum. Genet. 83 520–528.
49. Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ (2009), *A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity*, J. Lipid Res. 50 2111–2116.
50. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P et al. (2010), *Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease*, Hepatology 51 1209–1217.

51. Liu YL, Paltman GL, Leathart JB, Piquet AC, Burt AD, Dufour JF et al. (2014), *Carriage of the PNPLA3 rs738409C>G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma*, J. Hepatol. 61 75–81.
52. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, Vogt TF et al. (2014), *Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*, Nat. Genet. 46 352–356.
53. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. (2004), *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. Hepatology 40:1387–95.
54. Ruhl CE, Everhart JE (2003), *Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States*. Gastroenterology 124:71–9.
55. Balkau B, Charles MA (1999), *Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. Diabet Med 16:442–3.
56. Jou J, Choi SS, Diehl AM (2008), *Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease*. Semin Liver Dis 28:370–9.
57. Day CP, James OF (1998), *Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’?* Gastroenterology 114:842–5.
58. Day CP (2006), *From fat to inflammation*. Gastroenterology 130:207–10.
59. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. (2004), *Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway*. Hepatology 40:185–94.
60. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. (2007), *Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology 45:1366–74.
61. Jou J, Choi SS, Diehl AM (2008), *Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease*. Semin Liver Dis 28:370–9.
62. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, et al. (2003), *Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease*. Am J Pathol 163:1301–11.
63. Mormone E1, George J, Nieto N (2011), *Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches*. Chem Biol Interact. 193(3):225–31.
64. Dowman JK, Tomlinson JW & Newsome PN (2010), *Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease*. Q J Med 103:71–83.

65. Postic C, Girard J (2008), *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice*. J Clin Invest 118:829–38.
66. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005), *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest 115:1343–51
67. Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman CE, Neese RA, Tremaroli JD, Hirsch J (2000), *Relationship between carbohydrate induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects*. J Lipid Res 41:595–604.
68. Parks EJ (2002), *Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations*. Br J Nutr 87 (Suppl. 2):S247–53.
69. Adams LA, Angulo P, Lindor KD (2005), *Nonalcoholic fatty liver disease*. CMAJ 172:899–905.
70. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS (2002), *Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology 35:898–904.
71. Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, et al. (2004), *Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol 40:781–6.
72. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ (2000), *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. Nat Immunol 1:113–8.
73. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A (2002), *Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Endocr Rev 23:201–29.
74. Stefan N, Kantartzis K, Haring HU (2008), *Causes and metabolic consequences of fatty liver*. Endocr Rev 29:939–60.
75. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006), *Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol 7:85–96.
76. McCullough AJ (2006), *Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis*. J Clin Gastroenterol 40 (3 Suppl. 1):S17–29.
77. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J et al. (2005), *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB*. Nat Med 11:183–90.
78. Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, Yu XX, Liu ZX, Morino K et al. (2007), *Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense*

- oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance.* J Biol Chem 3; 282:22678–88.
79. Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I et al. (2006), *Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2.* J Hepatol 44:1167–74.
 80. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J (2004), *Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?* Hepatology 40:46–54.
 81. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A et al. (2001), *Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients.* Hepatology 34:1158–63.
 82. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M et al. (2001), *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta.* Science 293:1673–7.
 83. Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD (2004), *A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis.* Am J Gastroenterol 99:2365–8.
 84. Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A et al. (2006), *Tumour necrosis factor alpha signaling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice.* Gut 55:415–24.
 85. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA (2005), *Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity.* Endocrinology 146:3417–27.
 86. Tarantino G, Conca P, Pasanisi F, Ariello M, Mastrolia M, Arena A et al. (2009), *Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis?* Eur J Gastroenterol Hepatol 21:504–11.
 87. van der PD, Milner KL, Hui J, Hodge A, Trenell MI, Kench JG et al. (2008), *Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease.* Hepatology 48:449–57.
 88. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S et al. (2004), *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer.* Nature 431:461–6.
 89. Mantzoros CS (1999), *The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence.* Ann Intern Med 130:671–80.
 90. Lord G (2002), *Role of leptin in immunology.* Nutr Rev (10 Pt 2):S35–8.
 91. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS (2005), *Leptin in immunology.* J Immunol 174:3137–42.
 92. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA (2002), *Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice.* Hepatology 35:762–71.

93. Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB (2006), *Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab 8:264–80.
94. Berg AH, Combs TP, Scherer PE (2002), *ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab 13:84–9.
95. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ (2003), *The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice*. J Clin Invest 112:91–100.
96. Tomita K, Oike Y, Teratani T, Taguchi T, Noguchi M, Suzuki T et al. (2008), *Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice*. Hepatology 48:458–73.
97. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons- Romero F et al. (2005), *Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis*. Gut 54:117–21.
98. Lemoine M, Ratziu V, Kim M, Maachi M, Wendum D, Paye F et al. (2009), *Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease*. Liver Int 29:1431–8.
99. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K (2002), *In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases*. J Hepatol 37:56–62.
100. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK et al. (2001), *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities*. Gastroenterology 120:1183–92.
101. Petta S, Muratore C, Craxi A (2009), *Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future*. Dig Liver Dis 41:615–25.
102. Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, et al. (2003), *Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology 38:999–1007.
103. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C (1996), *Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation*. Gastroenterology 111:1645–53.
104. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C (1998), *Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology 27:128–33.
105. Kathirvel E, Morgan K, French SW, Morgan TR (2009), *Overexpression of liver-specific cytochrome P4502E1 impairs hepatic insulin signaling in a transgenic mouse model of nonalcoholic fatty liver disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol 21:973–83.

106. Cope K, Risby T, Diehl AM (2000), *Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis*. Gastroenterology JID – 0374630 119:1340–7.
107. Solga SF, Diehl AM (2003), *Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics*. J Hepatol 38:681–7.
108. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG (2001), *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Gut 48:206–11.
109. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R et al. (2009), *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology 49:1877–87.
110. Hocking MP, Davis GL, Franzini DA, Woodward ER (1998), *Long-term consequences after jejunioileal bypass for morbid obesity*. Dig Dis Sci 43:2493–9.
111. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D’Auria MV, De Simone C et al. (2005), *Beneficial effects of a probiotic VSL #3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases*. J Clin Gastroenterol 39:540–3.
112. Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P et al. (2009), *Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats*. J Nutr 139:905–11.
113. Rockall AG, Sohaib SA, Evans D, Kaltsas G, Isidori AM, Monson JP et al. (2003), *Hepatic steatosis in Cushing’s syndrome: a radiological assessment using computed tomography*. Eur J Endocrinol 149:543–8.
114. Tomlinson JW, Finney J, Gay C, Hughes BA, Hughes SV, Stewart PM (2008), *Impaired glucose tolerance and insulin resistance are associated with increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and elevated hepatic 5alpha-reductase activity*. Diabetes 57:2652–60.
115. Hermanowski-Vosatka A, Balkovec JM, Cheng K, Chen HY, Hernandez M, Koo GC et al. (2005), *11beta-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice*. J Exp Med 202:517–27.
116. Andrews RC, Rooyackers O, Walker BR (2003), *Effects of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab 88:285–91.

117. Konopelska S, Kienitz T, Hughes B, Pirlich M, Bauditz J, Lochs H et al. (2009), *Hepatic 11beta-HSD1 mRNA expression in fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis*. Clin Endocrinol (Oxf) 70:554–60.
118. Sell S (2001), *Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells*. Hepatology 33:738–50.
119. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P et al. (2004), *Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers*. Hepatology 39:1739–45.
120. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS et al. (2007), *Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction*. Gastroenterology 133:80–90.
121. Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marzioni M (2008), *Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition*. Liver Int 28:1052–64.
122. Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y (2006), *Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation*. Am J Pathol 168:1500–12.
123. Van Hul NK, Abarca-Quinones J, Sempoux C, Horsmans Y, Leclercq IA (2009), *Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury*. Hepatology 49:1625–35.
124. Wilfred de Alwis NM, Day CP (2007), *Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease*. Semin Liver Dis 27:44–54.
125. Sermasathanasawadi R, Kato N, Muroyama R, Dharel N, Shao RX, Chang JH et al. (2008), *Association of interferon regulatory factor-7 gene polymorphism with liver cirrhosis in chronic hepatitis C patients*. Liver Int 28:798–806.
126. Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I (2005), *Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease*. J Gastroenterol Hepatol 20:1102–8.
127. Guo J, Loke J, Zheng F, Hong F, Yea S, Fukata M et al. (2009), *Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses*. Hepatology 49:960–8.
128. Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE (2003), *Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese*. J Hepatol 39:967–71.

129. Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Uchiyama T, Mawatari H, et al. (2009), *Association between angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease*. Liver Int 29:1078–85.
130. Xu R, Tao A, Zhang S, Deng Y, Chen G (2015), *Association between patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease: a HuGE review and meta-analysis*. Sci Rep. 5:9284.
131. Dieck H, Döring F, Fuchs D, Roth H-P, Daniel H (2005), *Transcriptome and proteome analysis identifies the pathways that increase hepatic lipid accumulation in zinc-deficient rats*. J Nutr. 135(2):199-205.
132. Leggett RW, Williams LR, Melo DR et al. (2003), *A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body*. Sci Total Environ 317: 235–255.
133. Rosoff B, Cohn SH, Spencer HI (1963), *Cesium-137 metabolism in man*. Radiat Res 19:643–654.
134. Hasan M, Ali SF (1981), *Effects of thallium, nickel, and cobalt administration of the lipid peroxidation in different regions of the rat brain*. Toxicol Appl Pharmacol. 57(1):8-13.
135. Hultin T, Näslund PH (1974), *Effects of thallium (I) on the structure and functions of mammalian ribosomes*. Chem Biol Interact. 8(5):315-28.
136. Limos CL, Ohnishi A, Suzuki N et al. (1982), *Axonal degeneration and focal muscle fiber necrosis in human thallotoxicosis: histopathological studies of nerve and muscle*. Muscle Nerve 5:598-706.
137. Atsmon J, Taliansky E, Landau M et al. (2000), *Thallium poisoning in Israel*. Am J Med Sci 320(5):327-330.
138. Mulkey JP, Oehme FW (1993), *A review of thallium toxicity*. Vet Hum Toxicol. 35:445-453.
139. Ibrahim, Samar H (2016), *Omega-3 Fatty Acid-rich Parenteral Nutrition: Is It a Double-edged*. Sword Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition Volume 62 - Issue 5 - p e46–e47 doi: 10.1097/MPG.0000000000001091.
140. Zhong W, Zhao Y, Sun X, Song Z, McClain C, Zhou Z Dietary (2013), *Zinc Deficiency Exaggerates Ethanol-Induced Liver Injury in Mice: Involvement of Intrahepatic and Extrahepatic Factors* PLoS ONE, vol. 8, issue 10.
141. Patman G, Hui KY, Anstee QM et al. (2012), *PMO-124 Oxidative stress induces alternative splicing and nuclear translocation of kruppel like factor 6*, Gut 61:A123.
142. Yang M, Dai J, Jia Y, Suo L, Li S, Guo Y, Liu H, Li L, Yang G (2014), *Overexpression of juxtaposed with another zinc finger gene 1 reduces proinflammatory cytokine release via*

- inhibition of stress-activated protein kinases and nuclear factor- κ B*. FEBS Journal, vol. 281, issue 14 pp. 3193-3205 Published by Blackwell Publishing Ltd.
143. Mizuno D, Kawahara M (2013), *The molecular mechanisms of zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type senile dementia*. International Journal of Molecular Sciences, vol. 14, issue 11 pp. 22067-22081.
 144. Stepan H, Philipp A, Roth I, Kralisch S, Jank A, Schaarschmidt W, Lössner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M (2012), *Serum levels of the adipokine zinc- α 2-glycoprotein are increased in preeclampsia*. Journal of Endocrinological Investigation, vol. 35, issue 6 pp. 562-565.
 145. Villaverde MS, Hanzel CE, Verstraeten SV (2004), *In vitro interactions of thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defence system*. Free Radical Res. 38(9), 977–984.
 146. Ferrannini E, Wahren J, Faber OK, Felig P, Binder C, DeFronzo RA (1983), *Splanchnic and renal metabolism of insulin in human subjects: a dose-response study*. Am J Physiol. 244(6):E517-E527.
 147. Ioanna-Panayiota Kalafati (2017), *Non Alcoholic Fatty Liver. Role of genetics and Environment Factors*. Proposal for Doctoral Survey.
 148. Sherif ZA, Saeed A, Ghavimi S et al. (2016), *Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Perspectives on US Minority Populations*. Dig Dis Sci 61:1214. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4143-0>.
 149. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S (1997), *Review Nonalcoholic steatohepatitis*. Ann Intern Med. 126(2):137-45.
 150. Sumner AE, Cowie CC (2008), *Atherosclerosis. Ethnic differences in the ability of triglyceride levels to identify insulin resistance*. Atherosclerosis 196(2):696-703. Epub 2007 Jan 24.
 151. Liu JX1, Liu J, Li PQ, Xie XD, Guo Q, Tian LM, Ma XQ, Zhang JP, Liu J, [Gao JY](#) (2008), *Association of sterol regulatory element-binding protein-1c gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus, insulin resistance and blood lipid levels in Chinese population*. Diabetes Res Clin Pract. 82(1):42-7. doi: 10.1016/j.diabres.2008.06.017. Epub 2008 Aug 8.
 152. Musso G, Bo S, Cassader M, De Michieli F & Gambino R (2013), *Impact of sterol regulatory element-binding factor-1c polymorphism on incidence of nonalcoholic fatty liver disease and on the severity of liver disease and of glucose and lipid dysmetabolism*. Am J Clin Nutr 98, 895–906.

153. Knebel B, et al. (2012), *Liver-specific expression of transcriptionally active SREBP-1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass*. Plos One 7, e31812.
154. Krawczyk M, Grunhage F & Lammert F (2013), *Identification of combined genetic determinants of liver stiffness within the SREBP1c-PNPLA3 pathway*. International journal of molecular sciences 14, 21153–21166.
155. Kanoni S1, Nettleton JA, Hivert MF, Ye Z, van Rooij FJ, Shungin D, Sonestedt E, Ngwa JS, Wojczynski MK, Lemaitre RN, Gustafsson S, Anderson JS, Tanaka T, Hindy G, Saylor G, Renstrom F, Bennett AJ, van Duijn CM, Florez JC, Fox CS, Hofman A, Hoogeveen RC, Houston DK, Hu FB, Jacques PF, Johansson I, Lind L, Liu Y, McKeown N, Ordovas J, Pankow JS, Sijbrands EJ, Syvänen AC, Uitterlinden AG, Yannakoulia M, Zillikens MC; MAGIC Investigators, Wareham NJ, Prokopenko I, Bandinelli S, Forouhi NG, Cupples LA, Loos RJ, Hallmans G, Dupuis J, Langenberg C, Ferrucci L, Kritchevsky SB, McCarthy MI, Ingelsson E, Borecki IB, Witteman JC, Orho-Melander M, Siscovick DS, Meigs JB, Franks PW, [Dedoussis GV](#) (2011), *Total zinc intake may modify the glucose-raising effect of a zinc transporter (SLC30A8) variant: a 14-cohort meta-analysis*. Diabetes. 60(9):2407-16. doi: 10.2337/db11-0176. Epub 2011 Aug 1.
156. Dupis J et al. (2010), [New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk](#). Nature Genetics. 42 (2):105–16. [doi:10.1038/ng.520](#). [PMC 3018764](#). [PMID 20081858](#).
157. Ide T1, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N (2004), *SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signaling in the liver*. Nat Cell Biol. 6(4):351-7. Epub 2004 Mar 14.
158. Ogihara T1, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, [Fujita T](#) (2002), *High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats*. [Hypertension](#) 40(1):83-9.
159. Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, Yu XX, Liu ZX, Morino K et al. (2007), *Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance*. J Biol Chem 3; 282:22678–88.
160. Videla L A & Pettinelli P (2012), *Misregulation of PPAR functioning and its pathogenic consequences associated with nonalcoholic fatty liver disease in human obesity*. PPAR Research.

161. Bego T, Dujic T, Mlinar B, Semiz S, Malenica M, Prnjavorac B, ..., Causević A (2011), *Association of PPARG and LPIN1 gene polymorphisms with metabolic syndrome and type 2 diabetes*. Medicinski Glasnik: Official Publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina, 8(1), 76–83.
162. Morgan A R, Fraser A G & Ferguson L R (2012), *Metallothionein genes: No association with Crohn's disease in a New Zealand population*. Journal of Negative Results in BioMedicine, 11(1).
163. Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, Shimizu T, Mita T, Kanazawa A, Imaizumi M O, Abe T et al. (2013), *The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance*. J. Clin. Invest. 123, 4513–4524.
164. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X (2009), *Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation*. Cell Metab. 9(4):327-38.
165. Wang RH, Kim HS, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng CX (2011), *Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance*. J Clin Invest. 121(11):4477-90.
166. Walker AK, Naar AM (2012), *SREBPs: regulators of cholesterol/lipids as therapeutic targets in metabolic disorders, cancers and viral diseases*. Clin Lipidol. 7:27–36.
167. Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, Wu SY, Chiang CM, Veenstra TD, Kemper JK (2010), *SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism*. J Biol Chem. 285(44):33959-70.
168. Kuningas M, Putters M, Westendorp R G J, Slagboom P E & van Heemst D (2007), *SIRT1 gene, age-related diseases, and mortality: the Leiden 85-plus study*. The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences, 62(9), 960–965. <https://doi.org/62/9/960> [pii].
169. De Mattia E & Toffoli G (2009), *C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation*. European Journal of Cancer, 45(8). 1333–1351.
170. Bezold G, Lange M, Peter RU (2001), *Homozygous Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Mutation and Male Infertility*. New England Journal of Medicine 344, 1172–1173. doi:10.1056/NEJM200104123441517.
171. Zhang D, Zhou Y, Han L, Ji H & Li J (2014), *The effect of MTHFR C677T polymorphism on type 2 diabetes mellitus with vascular complications in Chinese Han population: A meta-analysis*. Endocrine Journal, 61(7), 717–726.

172. Li J, Goh C E, Demmer R T, Whitcomb B W, Du P & Liu Z (2017), *Association between serum folate and insulin resistance among U.S. nondiabetic adults*. Scientific Reports, 7(1).
173. Leonardini A, Laviola L, Perrini S, Natalicchio A & Giorgino F (2009), *Cross-Talk between PPARgamma and Insulin Signaling and Modulation of Insulin Sensitivity*. PPAR Research, 818945.
174. Tellechea M L, Aranguren F, Perez M S, Cerrone G E, Frechtel G D & Taverna M J (2009), *Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene is associated with metabolic syndrome and surrogate measures of insulin resistance in healthy men: interaction with smoking status*. Circulation Journal, 73(11), 2118–2124.
175. Cauchi S, Del Guerra S, Choquet H et al. (2010), *Meta-analysis and functional effects of the SLC30A8 rs13266634 polymorphism on isolated human pancreatic islets*. Mol Genet Metab 100:77–82pmid:20138556.
176. Bui V Q, Stein A D, DiGirolamo A M, Ramakrishnan U, Flores-Ayala R C, Ramirez-Zea M, ..., Martorell R (2012), *Associations between serum C-reactive protein and serum zinc, ferritin, and copper in Guatemalan school children*. Biological Trace Element Research, 148(2), 154–160.
177. Bao B, Prasad A S, Beck F W J, Fitzgerald J T, Snell D, Bao G W, ..., Cardozo L J (2010), *Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: A potential implication of zinc as an atheroprotective agent*. American Journal of Clinical Nutrition, 91(6), 1634–1641.
178. De Paula R C S, Aneni E C, Costa A P R, Figueiredo V N, Moura F A, Freitas W M, ..., Sposito A C (2014), *Low zinc levels is associated with increased inflammatory activity but not with atherosclerosis, arteriosclerosis or endothelial dysfunction among the very elderly*. BBA Clinical, 2, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbaci.2014.07.002>.
179. Jung S, Kim MK, Choi BY (2015), *The Relationship between Zinc Status and Inflammatory Marker Levels in Rural Korean Adults Aged 40 and Older*. PLoS ONE 10(6): e0130016.
180. Hernandez-Escalante V M, Nava-Gonzalez E J, Voruganti V S, Kent J W, Haack K, Laviada-Molina H A, ..., Bastarrachea R A (2014), *Replication of obesity and diabetes-related SNP associations in individuals from Yucatan, Mexico*. Frontiers in Genetics, 5(NOV).
181. Olson T M & Terzic A (2010), *Human KATP channelopathies: diseases of metabolic homeostasis*. Pflugers Arch. 460, 295–306. doi: 10.1007/s00424-009-0771-y.

182. Spanswick D, Smith M A, Mirshamsi S, Routh V H & Ashford M L (2000), *Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats*. Nat. Neurosci. 3, 757–758. doi: 10.1038/77660.
183. Spanswick D, Smith M A, Groppi V E, Logan S D & Ashford M L (1997), *Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels*. Nature 390, 521–525.
184. Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y et al. (2001), *ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis*. Nat. Neurosci. 4, 507–512. doi: 10.1038/87455.
185. Baltaci AK, Mogulkoc R, Halifeoglu (2005), *Effects of zinc deficiency and supplementation on plasma leptin levels in rats*. I Biol Trace Elem Res. 104(1):41-6.
186. Chen MD, Lin PY (2000), *Zinc-induced hyperleptinemia relates to the amelioration of sucrose-induced obesity with zinc repletion*. Obes Res. 8(7):525-9.
187. MD, Yang VC, Alexander PS, Lin PY, Song YM (2001), *Effects of selected minerals on leptin secretion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice*. Chen Exp Biol Med (Maywood). 226(9):836-40.
188. Thompson D, Pepys MB, Wood SP (1999), *The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine*. Structure. 7 (2): 169–77. doi:[10.1016/S0969-2126\(99\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80023-9). PMID [10368284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10368284/).
189. Targher, G. (2006), *Relationship between high-sensitivity C-reactive protein levels and liver histology in subjects with non-alcoholic fatty liver disease*. Journal of Hepatology.
190. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, ..., Nakajima A (2007), *High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH*. Journal of Gastroenterology, 42(7), 573–582.
191. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM (2010), *Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance*. Diabetes, 59(2):347-57.
192. Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD (2010), *Leclercq IA Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance*. Lanthier N, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 298(1):G107-16.
193. Baltaci A & Mogulkoc R (2012), *Leptin and zinc relation: In regulation of food intake and immunity*. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 16(9), 611.

194. Buzzetti Elena et al. (2016), *The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Metabolism - Clinical and Experimental, Volume 65, Issue 8, 1038–1048
195. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, Gudnason V, Eiriksdottir G, Garcia ME, Launer LJ, Nalls MA, Clark JM, Mitchell BD, Shuldiner AR, Butler JL, Tomas M, Hoffmann U, Hwang SJ, Massaro JM, O'Donnell CJ, Sahani DV, Salomaa V, Schadt EE, Schwartz SM, Siscovick DS, NASH CRN., GIANT Consortium., MAGIC Investigators., Voight BF, Carr JJ, Feitosa MF, Harris TB, Fox CS, Smith AV, Kao WH, Hirschhorn JN, Borecki IB, (2011), *GOLD Consortium, Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits*. PLoS Genet. 7(3):e1001324.
196. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM et al. (2009), *Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors*. Gastroenterology, 137:865–872.
197. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM (2009), *Finding the missing heritability of complex diseases*. Nature, Oct 8; 461(7265):747-53.
198. Sladek R, Rocheleau G, Rung J et al. (2007), *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. Nature, 445 (7130): 881–5
199. Kayaaltı Z, Aliyev V & Söylemezoğlu T (2011), *The potential effect of metallothionein 2A –5 A/G single nucleotide polymorphism on blood cadmium, lead, zinc and copper levels*. Toxicology and Applied Pharmacology, 256(1), 1–7. doi:10.1016/j.taap.2011.06.023.
200. Craig GM, Evans SJ, Brayshaw BJ (1990), *An inverse relationship between serum zinc and C-reactive protein levels in acutely ill elderly hospital patients*. Postgraduate Medical Journal, 66:1025-1028.
201. Bao B, Prasad AS, Beck FW, Fitzgerald JT, Snell D, Bao GW, Singh T, Cardozo LJ (2010), *Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent*. Am J Clin Nutr. 91(6):1634-41. doi: 10.3945/ajcn.2009.28836.
202. Ananda S. Prasad (2013), *Discovery of Human Zinc Deficiency: Its Impact on Human Health and Disease*, Advances in Nutrition, Volume 4, Issue 2, Pages 176–190, <https://doi.org/10.3945/an.112.003210>.

203. Vangipurapu J, Stančáková A, Pihlajamäki J et al. (2011), *Diabetologia Association of indices of liver and adipocyte insulin resistance with 19 confirmed susceptibility loci for type 2 diabetes in 6,733 non-diabetic Finnish men*. *Diabetologia* 54(3):563-71. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1977-4>. Epub 2010 Dec 12.
204. Wainwright P & CD Byrne (2016), *Bidirectional Relationships and Disconnects between NAFLD and Features of the Metabolic Syndrome*. *Int J Mol Sci*, 17(3): p. 367.
205. Reiling E, van 't Riet E, Groenewoud M J, Welschen L M C, van Hove E C, Nijpels G, ..., 't Hart L M (2009), *Combined effects of single-nucleotide polymorphisms in GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B on fasting plasma glucose and type 2 diabetes risk*. *Diabetologia*, 52(9), 1866–1870. doi:10.1007/s00125-009-1413-9.
206. Jagadeesan S, Kaliyadan F (2018), *Acrodermatitis Enteropathica*. [Updated 2018 Sep 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
207. Li S, Qian J, Yang Y, Zhao W, Dai J, Bei J-X, ..., Zhou W (2012), *GWAS Identifies Novel Susceptibility Loci on 6p21.32 and 21q21.3 for Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B Virus Carriers*. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002791. doi:10.1371/journal.pgen.100279.
208. Miura K et al. (2010), *Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice*. *Gastroenterology*, 139(1): p. 323-34 e7.
209. Pirola CJ & Sookoian S (2015), *The dual and opposite role of the TM6SF2-rs58542926 variant in protecting against cardiovascular disease and conferring risk for nonalcoholic fatty liver: A meta-analysis*. *Hepatology*, 62(6): p. 1742-56.
210. Chambers JC, Zhang Wm Sehmi J et al. (2011), *Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma*. *Nat Genet*. 43(11):1131–8.
211. Sookoian S & Pirola CJ (2011), *Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology* 53:1883-94.
212. Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ et al. (2009), *The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver*. *Hum Mol Genet*. 18(21):4081–8.
213. Krawczyk M et al. (2017), *Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study*. *J Lipid Res*. 58(1): p. 247-255.
214. Agius L (2008), *Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism*. *Biochem J*, 414(1): p. 1-18.

215. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD et al. (2011), *Genome-Wide Association Analysis Identifies Variants Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease That Have Distinct Effects on Metabolic Traits*. PLoS Genet 7(3): e1001324. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001324>.
216. Wang JK et al. (2012), *Association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism at sites -308 and -238 with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis*. J Gastroenterol Hepatol, 27(4): p. 670-6.
217. Lin Y, Lian I, Kor C et al. (2017), *Association between soil heavy metals and fatty liver disease in men in Taiwan: a cross sectional study* BMJ Open 7:e014215. doi: 10.1136/bmjopen-2016-014215.
218. Zhai H, Chen C, Wang N, Chen Y, Nie X, Han B, ..., Lu Y (2017), *Blood lead level is associated with non-alcoholic fatty liver disease in the Yangtze River Delta region of China in the context of rapid urbanization*. Environmental Health, 16(1). doi:10.1186/s12940-017-0304-7.
219. Sun K, Lu J, Jiang Y, Xu M, Xu Y, Zhang J, ..., Ning G (2013), *Low serum potassium level is associated with nonalcoholic fatty liver disease and its related metabolic disorders*. Clinical Endocrinology, 80(3), 348–355. doi:10.1111/cen.12168.
220. Melnikov P, Zannoni L Z (2010), *Clinical effects of cesium intake*. Biological trace element research. 135 (1–3):1–9. doi:10.1007/s12011-009-8486-7. PMID 19655100.
221. Alberti KG et al. (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(16): p. 1640-5.
222. Johnson F & Giulivi C (2005), *Superoxide dismutases and their impact upon human health*. Molecular Aspects of Medicine, 26(4-5), 340–352. doi:10.1016/j.mam.2005.07.006.
223. Ilyas A, Shah MH (2016), *Multivariate statistical evaluation of trace metal levels in the blood of atherosclerosis patients in comparison with healthy subjects*. Heliyon 2(1):e00054. Published 2016 Jan 12. doi:10.1016/j.heliyon.2015.e00054.
224. Umamo, G. R., Martino, M., & Santoro, N. (2017). The Association between Pediatric NAFLD and Common Genetic Variants. *Children (Basel, Switzerland)*, 4(6), 49. doi:10.3390/children4060049
225. Galván-Arzate, S., Pedraza-Chaverrí, J., Medina-Campos, O. N., Maldonado, P. D., Vázquez-Román, B., Ríos, C., & Santamaría, A. (2005). Delayed effects of thallium in the

rat brain: Regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food and Chemical Toxicology*, 43(7), 1037–1045. doi:10.1016/j.fct.2005.02.006

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα Νο 1: KCNJ2, Kir2.1 και φαινότυποι υψηλής βαρύτητας

- [[PMID 12148092](#)] KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes.
- [[PMID 12796536](#)] PIP2 binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome.
- [[PMID 15851159](#)] Polymorphic ventricular tachycardia and KCNJ2 mutations.
- [[PMID 16217063](#)] Andersen-Tawil syndrome: new potassium channel mutations and possible phenotypic variation.
- [[PMID 17221872](#)] Genotype-phenotype correlations of KCNJ2 mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome.

Παράρτημα Νο 2: Proxys για τη λίστα SNPs (Πίνακας 6)

Proxy	Distance	RSquared	DPrime	Arrays	Chromosome	Coordinate_HG18		
rs266729	0	1.000	1.000	IBC	chr3	188042168	Zn	ADIPOQ
rs62292784	1423	1.000	1.000	None	chr3	188043591	Zn	ADIPOQ
rs57237328	8627	0.926	1.000	None	chr3	188033541	Zn	ADIPOQ
rs1801131	0	1.000	1.000	A6, I6Q, IM, IMD, IBC, OQ, CM, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, ICA, ICB, AAE, AAH	chr1	11777063	Zn	MTHFR
rs4846049	4111	0.895	1.000	IBC, OQ	chr1	11772952	Zn	MTHFR
rs2070424	0	1.000	1.000	AH, I1, IM, IMD, IBC, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr21	31961191	Zn	SOD1
rs2833475	5500	1.000	1.000	None	chr21	31966691	Zn	SOD1
rs4816405	6319	1.000	1.000	None	chr21	31954872	Zn	SOD1
rs2833476	7998	1.000	1.000	I2, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IWQ, O54, O5E	chr21	31969189	Zn	SOD1
rs16988427	11465	1.000	1.000	IM, IMD, IBC, CYT, OQ, AxM, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr21	31972656	Zn	SOD1
rs2833479	12495	1.000	1.000	A6, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr21	31973686	Zn	SOD1
rs2255140	14667	1.000	1.000	AX	chr21	31975858	Zn	SOD1
rs2833483	36084	1.000	1.000	None	chr21	31997275	Zn	SOD1
rs7279778	19456	0.892	1.000	None	chr21	31941735	Zn	SOD1
rs55745100	22956	0.892	1.000	None	chr21	31938235	Zn	SOD1
rs12483529	25479	0.892	1.000	None	chr21	31935712	Zn	SOD1
rs59300999	33043	0.892	1.000	None	chr21	31994234	Zn	SOD1
rs67963962	34775	0.892	1.000	None	chr21	31926416	Zn	SOD1
rs55867217	37114	0.892	1.000	None	chr21	31924077	Zn	SOD1
rs2070421	39804	0.892	1.000	AN, A5, A6	chr21	31921387	Zn	SOD1
rs8132771	39897	0.892	1.000	I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr21	31921294	Zn	SOD1
rs1024611	0	1.000	1.000	A6, I2, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IBC, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr17	29603901	Zn	CCL2
rs2857654	257	1.000	1.000	None	chr17	29603644	Zn	CCL2
rs2857656	2219	1.000	1.000	I1, IMD, O54, O5E, ICA, ICB	chr17	29606120	Zn	CCL2
rs13900	4123	1.000	1.000	IM, IMD, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr17	29608024	Zn	CCL2
rs991804	7937	1.000	1.000	I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, IBC, CYT, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr17	29611838	Zn	CCL2
rs7503519	11221	1.000	1.000	None	chr17	29615122	Zn	CCL2
rs4795894	11656	1.000	1.000	AG, AxM	chr17	29615557	Zn	CCL2
rs1574904	12280	1.000	1.000	None	chr17	29616181	Zn	CCL2
rs7210316	6281	0.962	1.000	ICA, ICB, AAH	chr17	29597620	Zn	CCL2
rs12943279	10640	0.962	1.000	None	chr17	29614541	Zn	CCL2
rs2887259	10824	0.962	1.000	None	chr17	29614725	Zn	CCL2
rs1080327	11878	0.962	1.000	AX, OQ, A10	chr17	29615779	Zn	CCL2

rs11870164	12109	0.962	1.000	OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr17	29591792	Zn	CCL2
rs1989055	12208	0.962	1.000	None	chr17	29616109	Zn	CCL2
rs11870347	12909	0.962	1.000	OQ	chr17	29616810	Zn	CCL2
rs3091315	13877	0.962	1.000	I1, IM, IMD, CYT, E1, E11, O54, O5E, OEE, AAE	chr17	29617778	Zn	CCL2
rs3091316	14186	0.962	1.000	A6	chr17	29618087	Zn	CCL2
rs1800795	0	1.000	1.000	AN, A5, A6, IMD, IBC, O54, O5E, ICA, ICB	chr7	22733170	Zn	IL-6
rs1800797	424	0.967	1.000	IM, IMD, IBC, OQ, AxM, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, ICA, ICB	chr7	22732746	Zn	IL-6
rs2069832	788	0.967	1.000	IM, IMD, IBC, CYT, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, ICA, ICB, AAH	chr7	22733958	Zn	IL-6
rs1474348	1263	0.967	1.000	IMD, IBC, O54, O5E, ICA, ICB	chr7	22734433	Zn	IL-6
rs1474347	1479	0.967	1.000	A6, IM, IMD, IBC, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, ICA, ICB, AAH	chr7	22734649	Zn	IL-6
rs11640851	0	1.000	1.000	None	chr16	55230728	Zn	IL-6
rs11647171	22	1.000	1.000	None	chr16	55230750	Zn	IL-6
rs904777	884	0.963	1.000	A6	chr16	55231612	Zn	IL-6
rs56125200	2272	0.963	1.000	None	chr16	55233000	Zn	IL-6
rs1599823	2590	0.963	1.000	AX, IMD, CYT, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, A10	chr16	55233318	Zn	IL-6
rs2297508	0	1.000	1.000	IBC, OQ	chr17	17656042	Zn	SREBF1
rs4925114	4047	1.000	1.000	I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, IWQ, O54	chr17	17651995	Zn	SREBF1
rs12453837	6471	1.000	1.000	None	chr17	17649571	Zn	SREBF1
rs11654081	7188	1.000	1.000	CYT, OQ, OE, O24	chr17	17648854	Zn	SREBF1
rs2350976	6788	0.959	1.000	I1, IM, IMD	chr17	17649254	Zn	SREBF1
rs455804	0	1.000	1.000	AS, A5, A6, OQ, AxM, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr21	30068040	Cs	GRIK1
rs417565	3616	1.000	1.000	None	chr21	30064424	Cs	GRIK1
rs465116	635	0.881	1.000	None	chr21	30067405	Cs	GRIK1
rs462637	2885	0.881	1.000	None	chr21	30070925	Cs	GRIK1
rs459617	5416	0.881	1.000	AS, A5, A6, I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, AAH	chr21	30062624	Cs	GRIK1
rs17697419	0	1.000	1.000	None	chr4	177845160	Cs	VEGFC
rs17697359	827	1.000	1.000	I2, I5, I6, I6Q, IM, IMD, OQ, IWQ	chr4	177844333	Cs	VEGFC
rs74936725	908	1.000	1.000	None	chr4	177844252	Cs	VEGFC
rs17651713	1764	1.000	1.000	None	chr4	177843396	Cs	VEGFC
rs80127973	1938	1.000	1.000	None	chr4	177847098	Cs	VEGFC
rs12510099	5213	1.000	1.000	None	chr4	177839947	Cs	VEGFC
rs79407333	9201	1.000	1.000	None	chr4	177835959	Cs	VEGFC
rs79091128	13955	1.000	1.000	None	chr4	177831205	Cs	VEGFC
rs78284899	15739	1.000	1.000	None	chr4	177829421	Cs	VEGFC
rs79089306	18627	1.000	1.000	None	chr4	177826533	Cs	VEGFC
rs12500758	18769	1.000	1.000	None	chr4	177826391	Cs	VEGFC
rs1485769	19283	1.000	1.000	None	chr4	177825877	Cs	VEGFC
rs10520358	20272	1.000	1.000	AH, A6, I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, CYT, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr4	177824888	Cs	VEGFC
rs6857881	21207	1.000	1.000	None	chr4	177823953	Cs	VEGFC
rs79821572	11223	0.938	1.000	None	chr4	177833937	Cs	VEGFC

rs12510479	23120	0.938	1.000	A6	chr4	177822040	Cs	VEGFC
rs2062414	25372	0.938	1.000	None	chr4	177819788	Cs	VEGFC
rs77539785	25616	0.938	1.000	None	chr4	177819544	Cs	VEGFC
rs28456106	25657	0.938	1.000	None	chr4	177819503	Cs	VEGFC
rs75890831	26733	0.938	1.000	None	chr4	177818427	Cs	VEGFC
rs77266832	27111	0.938	1.000	None	chr4	177818049	Cs	VEGFC
rs75348788	27189	0.938	1.000	None	chr4	177817971	Cs	VEGFC
rs2333526	0	1.000	1.000	I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, OQ, IWQ, O54, O5E	chr4	177940299	Cs	VEGFC
rs75183393	411	1.000	1.000	None	chr4	177940710	Cs	VEGFC
rs6836576	3940	1.000	1.000	None	chr4	177936359	Cs	VEGFC
rs11131755	7184	1.000	1.000	None	chr4	177933115	Cs	VEGFC
rs4488887	7471	1.000	1.000	AN, A5, A6	chr4	177932828	Cs	VEGFC
rs4569711	7584	1.000	1.000	None	chr4	177932715	Cs	VEGFC
rs4539988	7734	1.000	1.000	None	chr4	177932565	Cs	VEGFC
rs4481197	7785	1.000	1.000	None	chr4	177932514	Cs	VEGFC
rs13107976	8233	1.000	1.000	None	chr4	177932066	Cs	VEGFC
rs2333520	8344	1.000	1.000	None	chr4	177931955	Cs	VEGFC
rs7440052	8761	1.000	1.000	IM, IMD, IBC, O54, O5E	chr4	177931538	Cs	VEGFC
rs4260480	9383	1.000	1.000	AAH	chr4	177930916	Cs	VEGFC
rs6850777	10898	1.000	1.000	None	chr4	177929401	Cs	VEGFC
rs2333518	11226	1.000	1.000	None	chr4	177929073	Cs	VEGFC
rs2333517	11865	1.000	1.000	AH	chr4	177928434	Cs	VEGFC
rs4254710	12069	1.000	1.000	None	chr4	177928230	Cs	VEGFC
rs4555574	12111	1.000	1.000	None	chr4	177928188	Cs	VEGFC
rs13130306	12335	1.000	1.000	None	chr4	177927964	Cs	VEGFC
rs10000179	12981	1.000	1.000	None	chr4	177927318	Cs	VEGFC
rs6811409	13027	1.000	1.000	None	chr4	177927272	Cs	VEGFC
rs4557213	14172	1.000	1.000	IM, IMD, IBC, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr4	177926127	Cs	VEGFC
rs2333516	14416	1.000	1.000	None	chr4	177925883	Cs	VEGFC
rs2333515	14655	1.000	1.000	None	chr4	177925644	Cs	VEGFC
rs11722199	15588	1.000	1.000	None	chr4	177924711	Cs	VEGFC
rs10031801	16858	1.000	1.000	None	chr4	177923441	Cs	VEGFC
rs10031290	17410	1.000	1.000	None	chr4	177922889	Cs	VEGFC
rs2333513	17743	1.000	1.000	None	chr4	177922556	Cs	VEGFC
rs7688514	18320	1.000	1.000	AX, AS, A5, A6	chr4	177921979	Cs	VEGFC
rs1319998	19435	1.000	1.000	AX	chr4	177920864	Cs	VEGFC
rs1319999	19847	1.000	1.000	None	chr4	177920452	Cs	VEGFC
rs6857752	20616	1.000	1.000	AS, A5, A6, IBC	chr4	177919683	Cs	VEGFC
rs11727268	21753	1.000	1.000	None	chr4	177918546	Cs	VEGFC
rs6819436	22046	1.000	1.000	None	chr4	177918253	Cs	VEGFC
rs623307	31544	1.000	1.000	I2, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IWQ, O54, O5E	chr4	177908755	Cs	VEGFC
rs620653	32129	1.000	1.000	None	chr4	177908170	Cs	VEGFC
rs18131	33214	1.000	1.000	None	chr4	177907085	Cs	VEGFC
rs80220941	37334	1.000	1.000	None	chr4	177902965	Cs	VEGFC
rs77912608	38002	1.000	1.000	None	chr4	177902297	Cs	VEGFC
rs28549799	40775	1.000	1.000	None	chr4	177899524	Cs	VEGFC
rs10012721	44230	1.000	1.000	IM, IMD, IBC, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr4	177896069	Cs	VEGFC
rs475106	46515	1.000	1.000	I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr4	177893784	Cs	VEGFC
rs4254711	49780	1.000	1.000	None	chr4	177890519	Cs	VEGFC
rs512564	53649	1.000	1.000	None	chr4	177886650	Cs	VEGFC
rs512533	53658	1.000	1.000	AH	chr4	177886641	Cs	VEGFC
rs73872162	66295	1.000	1.000	None	chr4	177874004	Cs	VEGFC
rs73872161	69099	1.000	1.000	None	chr4	177871200	Cs	VEGFC
rs73872160	70009	1.000	1.000	None	chr4	177870290	Cs	VEGFC

rs78314693	71259	1.000	1.000	None	chr4	177869040	Cs	VEGFC
rs74504775	73786	1.000	1.000	None	chr4	177866513	Cs	VEGFC
rs75529268	76583	1.000	1.000	None	chr4	177863716	Cs	VEGFC
rs7682290	607	0.901	1.000	None	chr4	177939692	Cs	VEGFC
rs4274794	7577	0.901	1.000	None	chr4	177932722	Cs	VEGFC
rs2877966	8365	0.901	1.000	None	chr4	177931934	Cs	VEGFC
rs10020321	11165	0.901	1.000	None	chr4	177951464	Cs	VEGFC
rs10000057	13228	0.901	1.000	None	chr4	177927071	Cs	VEGFC
rs11932350	13975	0.901	1.000	None	chr4	177926324	Cs	VEGFC
rs11131762	15074	0.901	1.000	A6	chr4	177955373	Cs	VEGFC
rs11734356	15587	0.901	1.000	None	chr4	177924712	Cs	VEGFC
rs2333532	15606	0.901	1.000	AH, I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, IWQ, O54, O5E	chr4	177955905	Cs	VEGFC
rs75996561	15913	0.901	1.000	None	chr4	177956212	Cs	VEGFC
rs77663100	15986	0.901	1.000	None	chr4	177956285	Cs	VEGFC
rs74910338	16032	0.901	1.000	None	chr4	177956331	Cs	VEGFC
rs10866206	16208	0.901	1.000	AN, A5, A6	chr4	177956507	Cs	VEGFC
rs11131763	16288	0.901	1.000	AN, A5, A6	chr4	177956587	Cs	VEGFC
rs2333523	16629	0.901	1.000	AH, AN, A5, A6	chr4	177956928	Cs	VEGFC
rs11131764	17054	0.901	1.000	I2, I5, I6, I6Q, IM, IMD, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr4	177957353	Cs	VEGFC
rs12502265	17259	0.901	1.000	None	chr4	177957558	Cs	VEGFC
rs10019742	17402	0.901	1.000	None	chr4	177922897	Cs	VEGFC
rs2333524	17451	0.901	1.000	None	chr4	177957750	Cs	VEGFC
rs2333525	17672	0.901	1.000	AH	chr4	177957971	Cs	VEGFC
rs1995084	18998	0.901	1.000	None	chr4	177959297	Cs	VEGFC
rs2333512	19108	0.901	1.000	AX, I6Q, IMD, ICQ, IWQ, O54, O5E	chr4	177921191	Cs	VEGFC
rs2333565	24895	0.901	1.000	AN, A5, A6	chr4	177965194	Cs	VEGFC
rs78527821	26618	0.901	1.000	None	chr4	177966917	Cs	VEGFC
rs12500990	29083	0.901	1.000	None	chr4	177969382	Cs	VEGFC
rs650911	29964	0.901	1.000	None	chr4	177910335	Cs	VEGFC
rs76453543	31640	0.901	1.000	None	chr4	177971939	Cs	VEGFC
rs78099274	36421	0.901	1.000	None	chr4	177976720	Cs	VEGFC
rs2333555	36837	0.901	1.000	AAH	chr4	177977136	Cs	VEGFC
rs4690465	37296	0.901	1.000	None	chr4	177977595	Cs	VEGFC
rs6832217	44524	0.901	1.000	None	chr4	177984823	Cs	VEGFC
rs73872194	51938	0.901	1.000	None	chr4	177992237	Cs	VEGFC
rs73872195	52296	0.901	1.000	None	chr4	177992595	Cs	VEGFC
rs77127537	54416	0.901	1.000	None	chr4	177994715	Cs	VEGFC
rs585706	54641	0.901	1.000	None	chr4	177885658	Cs	VEGFC
rs74477505	56453	0.901	1.000	None	chr4	177996752	Cs	VEGFC
rs78150859	62296	0.901	1.000	None	chr4	178002595	Cs	VEGFC
rs74945917	65756	0.901	1.000	None	chr4	178006055	Cs	VEGFC
rs73872207	73163	0.901	1.000	None	chr4	178013462	Cs	VEGFC
rs73872211	82137	0.901	1.000	None	chr4	178022436	Cs	VEGFC
rs7678501	84143	0.901	1.000	None	chr4	178024442	Cs	VEGFC
rs7658593	84193	0.901	1.000	None	chr4	178024492	Cs	VEGFC
rs7658632	84256	0.901	1.000	AS, A5, A6	chr4	178024555	Cs	VEGFC
rs7658479	84270	0.901	1.000	AS, A5, A6	chr4	178024569	Cs	VEGFC
rs41501449	84302	0.901	1.000	AS, A5, A6	chr4	178024601	Cs	VEGFC
rs7684706	84919	0.901	1.000	None	chr4	178025218	Cs	VEGFC
rs10017603	85215	0.901	1.000	None	chr4	178025514	Cs	VEGFC
rs6827066	85715	0.901	1.000	None	chr4	178026014	Cs	VEGFC
rs6850178	85781	0.901	1.000	I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, CYT, OQ, IWQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, AAH	chr4	178026080	Cs	VEGFC
rs10020819	86290	0.901	1.000	None	chr4	178026589	Cs	VEGFC

rs6552199	87540	0.901	1.000	None	chr4	178027839	Cs	VEGFC
rs28463368	89334	0.901	1.000	None	chr4	178029633	Cs	VEGFC
rs10030529	89615	0.901	1.000	None	chr4	178029914	Cs	VEGFC
rs10020301	89732	0.901	1.000	None	chr4	178030031	Cs	VEGFC
rs73872215	89740	0.901	1.000	None	chr4	178030039	Cs	VEGFC
rs10008972	90159	0.901	1.000	None	chr4	178030458	Cs	VEGFC
rs6552200	90538	0.901	1.000	IM, IMD	chr4	178030837	Cs	VEGFC
rs6552201	90608	0.901	1.000	None	chr4	178030907	Cs	VEGFC
rs7678096	90631	0.901	1.000	None	chr4	178030930	Cs	VEGFC
rs7678693	90900	0.901	1.000	None	chr4	178031199	Cs	VEGFC
rs6843420	91969	0.901	1.000	None	chr4	178032268	Cs	VEGFC
rs6848276	92243	0.901	1.000	None	chr4	178032542	Cs	VEGFC
rs6848996	92367	0.901	1.000	None	chr4	178032666	Cs	VEGFC
rs6849252	92608	0.901	1.000	None	chr4	178032907	Cs	VEGFC
rs56171181	105892	0.901	1.000	None	chr4	178046191	Cs	VEGFC
rs17063879	110389	0.901	1.000	AN, A6	chr4	178050688	Cs	VEGFC
rs11076161	0	1.000	1.000	IM, IMD	chr16	55230649	Tl	MT1A
rs11076160	5	1.000	1.000	IM, IMD, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr16	55230644	Tl	MT1A
rs57778164	4486	1.000	1.000	None	chr16	55235135	Tl	MT1A
rs8052394	0	1.000	1.000	None	chr16	55231329	Tl	MT1A
rs8056289	332	0.925	1.000	IM, IMD	chr16	55230997	Tl	MT1A
rs8049883	418	0.925	1.000	A6, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr16	55230911	Tl	MT1A
rs7190725	538	0.925	1.000	IM, IMD, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, AAH	chr16	55230791	Tl	MT1A
rs9922957	1448	0.925	1.000	None	chr16	55229881	Tl	MT1A
rs35346959	1961	0.925	1.000	None	chr16	55229368	Tl	MT1A
rs1610214	2060	0.925	1.000	AX, A10	chr16	55233389	Tl	MT1A
rs7201401	3367	0.925	1.000	None	chr16	55227962	Tl	MT1A
rs13331433	5971	0.925	1.000	None	chr16	55237300	Tl	MT1A
rs1610211	6529	0.925	1.000	A6	chr16	55237858	Tl	MT1A
rs12932184	7760	0.925	1.000	None	chr16	55239089	Tl	MT1A
rs35264105	7869	0.925	1.000	None	chr16	55239198	Tl	MT1A
rs12447004	9685	0.925	1.000	None	chr16	55221644	Tl	MT1A
rs12926482	10442	0.925	1.000	None	chr16	55241771	Tl	MT1A
rs9932570	10471	0.925	1.000	None	chr16	55220858	Tl	MT1A
rs7198217	11124	0.925	1.000	None	chr16	55242453	Tl	MT1A
rs7198368	11161	0.925	1.000	None	chr16	55242490	Tl	MT1A
rs7198427	11252	0.925	1.000	AS, A5, A6, I1, IM, IMD, CYT, OQ, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE, AAH	chr16	55242581	Tl	MT1A
rs8060024	11476	0.925	1.000	None	chr16	55242805	Tl	MT1A
rs6499849	13624	0.925	1.000	None	chr16	55244953	Tl	MT1A
rs6499850	13810	0.925	1.000	AN, A5, A6	chr16	55245139	Tl	MT1A
rs12598354	14940	0.925	1.000	None	chr16	55246269	Tl	MT1A
rs7193812	15525	0.925	1.000	I2, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IWQ, O54, O5E, AAH	chr16	55246854	Tl	MT1A
rs7200901	15570	0.925	1.000	None	chr16	55246899	Tl	MT1A
rs2014584	15856	0.925	1.000	None	chr16	55247185	Tl	MT1A
rs1811679	15923	0.925	1.000	None	chr16	55247252	Tl	MT1A
rs75705444	16272	0.925	1.000	None	chr16	55247601	Tl	MT1A
rs78032789	16319	0.925	1.000	None	chr16	55247648	Tl	MT1A
rs8044791	17030	0.925	1.000	IM, IMD, CYT, OQ, CM, OE, O24, O28, O54, O5E, OEE	chr16	55248359	Tl	MT1A
rs2291956	18390	0.925	1.000	A6, I3, I5, I6, I6Q, IM, IMD, IC, ICQ, IWQ, AAH	chr16	55249719	Tl	MT1A