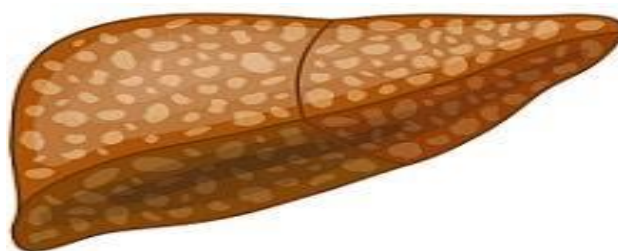


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ



FATTY LIVER

**Σύγκριση επιπέδων miRNA-21 στο πλάσμα ασθενών με NAFLD/NASH και υγιών
εθελοντών**

Νικόδημος Μοσχονάς

Αθήνα, 2019

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Δεδούσης

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

Ανδριάννα Καλιώρα

**Επίκουρη Καθηγήτρια στη Διατροφή του Ανθρώπου και Τροφίμων, Τμήμα
Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Γιώργος Παπανικολάου

**Επίκουρος Καθηγητής στην Παθοφυσιολογία-Γενετική του Ανθρώπου, Τμήμα
Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Ο Νικόδημος Μοσχονάς

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Ο πιο σίγουρος τρόπος για την επιτυχία είναι η συνέχιση της προσπάθειας.

Ο μόνος βέβαιος τρόπος για την αποτυχία είναι η διακοπή της προσπάθειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Γεώργιο Δεδούση για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου εμπιστεύτηκε την διεκπεραίωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, καθώς και για τις γνώσεις και την καθοδήγηση που μου μετέδωσε σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική ομάδα του κ. Δεδούση για την στήριξη τους, ιδιαίτερα όμως την υποψήφιο διδάκτορα κ. Χαραλαμπία Αμερικάνου για την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία της σε κάθε βήμα εκτέλεσης της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που είναι πάντοτε στο πλευρό μου σε όλη την πορεία μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
1. Εισαγωγή	15
1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά επιδημιολογία της NAFLD και της NASH	15
1.2 Παθοφυσιολογία της NAFLD και της NASH	16
1.2.1 Υπόθεση πολλαπλών κτυπημάτων	17
1.3 MicroRNAs-MicroRNA 21	25
1.3.1 Λειτουργίες, Χαρακτηριστικά και βιογένεση των microRNA	25
1.3.2 Δράση miRNA's	26
1.3.3 Ο ρόλος των miRNA στην NAFLD	28
1.3.3 Η δράση του MiRNA 21 και ο ρόλος του στην ανθρώπινη παθολογία	28
1.4 Διάγνωση και αντιμετώπιση της NAFLD και της NASH	31
1.4.1 Μέθοδοι διάγνωσης της NASH και της NAFLD	31
1.4.2 Διαχείριση και Αντιμετώπιση της NAFLD και της NASH	32
2. Σκοπός	34
3. Μεθοδολογία	35
3.1 Σχεδιασμός Μελέτης και Περιγραφή δείγματος	35
3.2 Δεδομένα του δείγματος	35
3.3 Πρωτόκολλο Απομόνωσης ολικού RNA από το πλάσμα των εθελοντών	36
3.4 Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA	37
3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου RT-PCR	38
3.6 Εφαρμογή κανονικοποίησης με τον μέσο όρο έκφρασης επιλεγμένων microRNAs και κανονικοποίησης με την χρήση εξωγενούς microRNA για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων	38
3.7 Στατιστική ανάλυση	39
4. Αποτελέσματα	40
4.1 Χαρακτηριστικά του δείγματος	40
4.2 Αποτελέσματα των μετρήσεων του hsa-miR-21-5p	42

4.3 Επίδραση Ανθρωπομετρικών και Βιοχημικών μεταβλητών στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p	44
5. Συζήτηση	49
5.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων	49
5.2 Συμπεράσματα.....	51
5.3 Περιορισμοί	51
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

Περίληψη

Εισαγωγή : Ως μη αλκοολική λιπώδης διήθηση ήπατος (NAFLD) ορίζεται η συσσώρευση λίπους υπό μορφή μεγάλων φυσαλίδων στα ηπατοκύτταρα. Η φυσική εξέλιξή της είναι η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) που χαρακτηρίζεται από την παρουσία φλεγμονής και κυτταρικού θανάτου. Λόγω της αύξησης του επιπολασμού της νόσου, εξετάζονται καινούργιες τεχνικές και μόρια για την καλύτερη πρόγνωση, παρακολούθηση της εξέλιξης και θεραπείας της νόσου. Μέχρι στιγμής, ο πιο αποτελεσματικός τρόπος διαχείρισης της νόσου είναι οι αλλαγές στον τρόπο ζωής μέσω της δίαιτας και της φυσικής δραστηριότητας. Τα microRNA ή miRNA αποτελούν μικρά μόρια RNA που ρόλο τους αποτελεί η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Το microRNA-21 εμπλέκεται στη διαδικασία της φλεγμονής και στην NAFLD.

Σκοπός: Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εξετάζονται οι διαφορές των επιπέδων του microRNA-21 στο πλάσμα ασθενών με NAFLD και NASH σε σχέση με υγιή πληθυσμό. Επιπλέον, εξετάστηκε η συσχέτιση των επιπέδων του με διάφορους κλινικούς δείκτες και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά.

Μεθοδολογία : Το δείγμα χωρίστηκε σε τρεις ομάδες, την ομάδα ελέγχου (N=21), την ομάδα των ασθενών με NAFLD (N=17) και την ομάδα των ασθενών με NASH (N=26). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την εξέταση των επιπέδων του miRNA-21 στο πλάσμα ασθενών με NAFLD, NASH και υγιών εθελοντών. Η διαφορά των μέσων για τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA. Πραγματοποιήθηκαν γραμμικές παλινδρομήσεις για την εξέταση της συσχέτισης των βιοχημικών δεικτών, των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών και των σκορ NFS, FIB4, NASH με τα επίπεδα του microRNA-21.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του miRNA-21 στο πλάσμα της ομάδας NASH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα NAFLD μετά από κανονικοποίηση με εξωγενές miRNA (cel-miR-39-3p) ($p < 0,05$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων του miRNA-21 με τα επίπεδα της ινσουλίνης, όμως η σχέση χάθηκε έπειτα από διόρθωση για την λήψη φαρμάκων ($p\text{-value} < 0,05$). Η συσχέτιση των επιπέδων του miRNA-21 με το HOMA-IR παρέμεινε στατιστικώς σημαντική και έπειτα από διορθώσεις για διάφορους συμπαράγοντες μεταξύ των οποίων και η λήψη φαρμάκων για το διαβήτη ($p < 0,05$).

Συμπεράσματα/Συζήτηση: Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του miRNA-21 με την πρόοδο της νόσου (NASH). Επιπλέον, τα επίπεδα του miRNA-21 συσχετίστηκαν με την αντίσταση στην

ινσουλίνη. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί μέσω των γονιδίων στόχων του miRNA-21 που προάγουν την φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες.

Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined as the accumulation of macrophyllabitic fat in hepatocytes. The progression of the disease is called non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and is defined by the necroinflammation which occurs. Due to the increase in the prevalence of the disease, novel techniques and molecules are being investigated for better screening, monitoring and treatment of the disease. The most effective way to manage the disease so far is to change the lifestyle through diet and physical activity. MicroRNAs or miRNAs are small molecules of RNA that play a role in regulating the expression of genes. MicroRNA-21 is involved in inflammation and NAFLD.

Aim: In the present study we compare the levels of plasma microRNA-21 between three groups: patients with NAFLD, patients with NASH and healthy adults. In addition, the correlation of the plasma levels of the microRNA with various clinical measurements and anthropometric features was examined.

Methodology: The sample was divided between three groups, the Control group (N=21), the NAFLD group (N=17) and the NASH group (N=26). The measurement of the levels of hsa-miR-21-5p in the participant's plasma was conducted with real time PCR. The differences in the means between the three groups were determined with ANOVA. To examine the correlation of various biochemical and anthropometric factors to the miRNA-21 levels linear regressions was conducted.

Results: A statistically significant difference in plasma levels of miRNA-21 was observed between the healthy and the NASH group and between the NAFLD and the NASH group ($p < 0,05$). A correlation of miRNA-21 levels with insulin levels was observed, but the relation was lost after correction for several covariates, including medication for diabetes mellitus. The correlation of miRNA-21 levels with HOMA-IR remained statistically significant after corrections for several covariates, including medication for diabetes mellitus ($p < 0,05$).

Discussion: An association of miRNA-21 levels with the progression of the disease has been observed. In addition, a relationship between the levels of miRNA-21 and insulin resistance was observed. This can be party explained by miRNA-21 target genes, that promote inflammation and oxidative stress.

Key words: Nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, miRNA, miRNA-21, HOMA-IR

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Επιπολασμός της NAFLD και η φυσική εξέλιξη της νόσου.....	15
Εικόνα 2: Υπόθεση πολλαπλών κτυπημάτων για την εγκαθίδρυση και πρόοδο της NAFLD.....	17
Εικόνα 3: Βιογένεση των microRNAs.....	26
Εικόνα 4: Διαφορετικοί τρόποι ρύθμισης της έκφρασης των mRNA από τα miRNAs.....	27
Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης του miRNA-21 στην δημιουργία στεάτωσης.....	3

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά πληθυσμού και συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων.....	40
Πίνακας 2: Αποτελέσματα για τον βαθμό ίνωσης των εθελοντών με τη χρήση των σκορ FIB-4 και NFS και συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων.....	41
Πίνακας 3 : Αποτελέσματα δεικτών βιοχημικής και μεταβολικής λειτουργίας των εθελοντών και συγκρίσεις μεταξύ των τριών ομάδων.....	42
Πίνακας 4: Σύγκριση των επιπέδων του hsa-miR-21-5p μεταξύ των τριών ομάδων.....	43
Πίνακας 5: Συσχετίσεις μεταξύ των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών, των βιοχημικών δεικτών και του βαθμού της ίνωσης των εθελοντών με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p.....	45
Πίνακας 6: Συσχέτιση των επιπέδων γλυκόζης, ινσουλίνης, της αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR), και της ίνωσης (FIB-4) με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, μετά από κανονικοποίηση με εξωγενές microRNA (cel-miR-39-3p) με την χρήση γραμμικής παλινδρόμησης.	46
Πίνακας 7: Προσδιορισμός της επίδρασης της οξαλοξικής τρανσαμινάσης (SGOT), της ινσουλίνης και της αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR) στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p (CT), με την χρήση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης.....	48
Πίνακας 8: Συσχέτιση των επιπέδων της οξαλοξικής αμινοτρανσεράσης στα επίπεδα του has-miR-21-5p έπειτα από κανονικοποίηση με τον μέσο όρο έκφρασης των τριών επιλεγμένων microRNA, με την χρήση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης.....	48
Γράφημα 1: Διαφορές στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p έπειτα από exogenous normalization μεταξύ των ομάδων.....	44

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

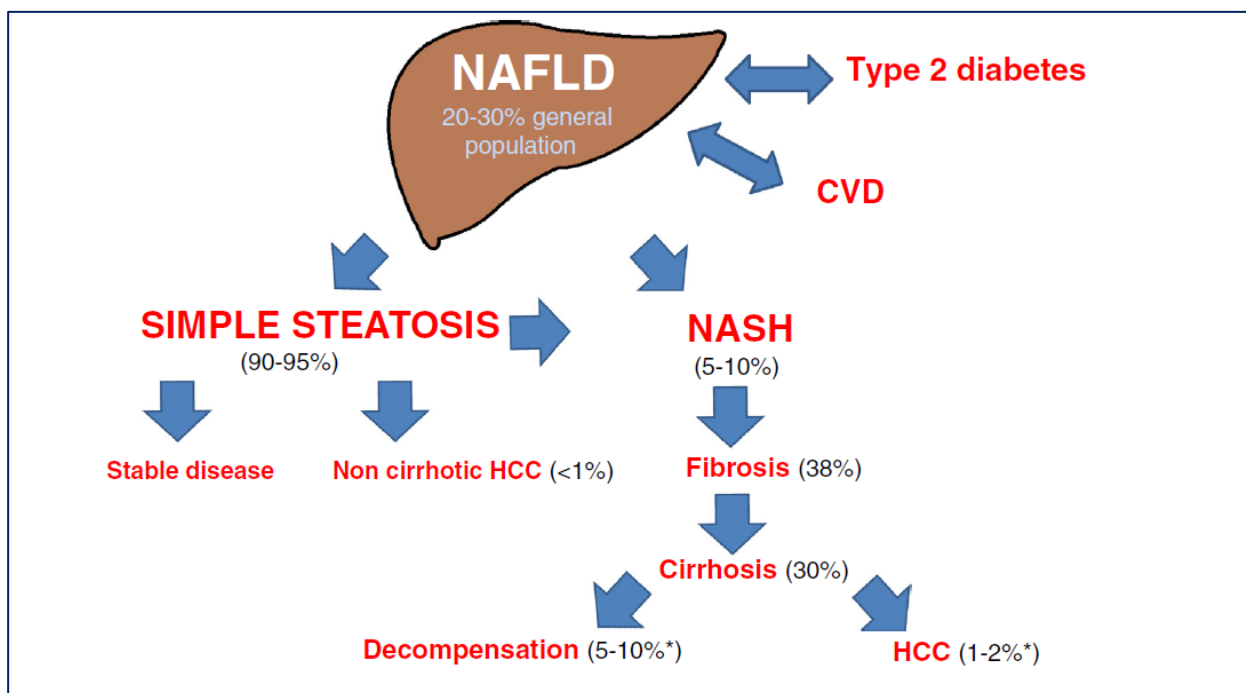
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
Mir-21	Micro RNA 21
Mrna	Messenger RNA
Pol II	Polymerase II
Pol III	Polymerase III
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
BMI	Body Mass Index
FFA	Free Fatty Acid
HCC	Hepatocellular Carcinoma
JNK	c-Jun N-terminal kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
HSC	Hepatic Stellate Cells
TNF-β	Tumor Necrosis Factor beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-1	Interleukin 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
LPS	Lipopolysaccharide
TLR	Toll Like Receptor
CD14	Cluster of Differentiation 14
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
ENP1	Essential nuclear protein 1
LDL	Low Density Lipoprotein
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
HMGCR	3-Hydroxy3-Methylglutaryl-CoA Reductase
GWAS	Genome-wide association study
GCKR	Glucokinase regulatory protein

NAS	NAFLD Activity Score
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily 2
DNMT	DNA methyltransferase
SLC2A1	Solute Carrier Family 2
SNP	Single nucleotide polymorphism
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	Serum glutamic-pyruvic transaminase
FIB-4	Fibrosis-4
TC	Total Cholesterol
TG	Total Triglycerides
FERR	Ferritin
FE	Iron
HOMA-IR	Homeostatic model assessment-Insulin Resistance
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
ALV	Albumin
LIF	Liver Inflammation and Fibrosis
NFS	NAFLD Fibrosis Score
CT	Cycle Threshold
HFE	Human hemochromatosis protein
SOD2	Superoxide dismutase 2
FOXO1	Forkhead box protein O1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
TPM1	Tropomyosin 1
HAT	Histone Acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
PDCD4	Programmed Cell Death 4
WHR	Waist to hip ratio
CT1	iron-corrected T1

1.Εισαγωγή

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά επιδημιολογία της NAFLD και της NASH

Η μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος (NAFLD) είναι η πιο συχνή ηπατική νόσος παγκοσμίως. Μελετήθηκε πρώτη φορά από τους Ludwick et al. ως μια άγνωστη νόσος του ήπατος⁽¹⁾. Σήμερα η NAFLD χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση λίπους υπό μορφή μεγάλων φυσαλίδων σε ηπατικά κύτταρα μεγαλύτερη του 5% του παρεγχύματος χωρίς ενδείξεις τραυματισμού των ηπατοκυττάρων⁽²⁾ με ημερήσια πρόσληψη αλκοόλ μικρότερη των 30 γραμμαρίων για τους άντρες και μικρότερη των 20 για τις γυναίκες⁽⁷⁵⁾. Ο όρος NAFLD περιλαμβάνει ένα εύρος καταστάσεων από την απλή συσσώρευση λιπώδους ιστού στο ήπαρ έως την ανάπτυξη στεατοηπατίτιδας (NASH), ίνωσης και κίρρωσης⁽³⁾. Πρόοδος της NAFLD αποτελεί η εγκαθίδρυση φλεγμονής, βλάβη του ιστού, κυτταρικού θανάτου και ίνωσης χαρακτηριστικά που συντελούν στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) που στην συνέχεια μπορεί να οδηγήσει σε κίρρωση και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Η NAFLD προβλέπεται ότι μέσα στα επόμενα 20 χρόνια θα αποτελεί την κύρια αιτία ηπατοσχετιζόμενων θανάτων και λόγο μεταμόσχευσης ήπατος. Επιπλέον η εγκαθίδρυσή και η πρόοδος της νόσου αυξάνουν την πιθανότητα θανάτου των ασθενών κατά 34%-69% τα επόμενα 15 χρόνια, σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό⁽⁴⁾.



Εικόνα 1: Επιπολασμός της NAFLD και η φυσική πρόοδος της νόσου.

Η NAFLD και η NASH έχουν παράγοντες κινδύνου τόσο γενετικής και επιγενετικής προέλευσης, οι οποίοι θα αναλυθούν περαιτέρω σε επόμενη ενότητα, αλλά και περιβαλλοντικούς που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής. Συγκεκριμένα, οι παράγοντες αυτοί είναι όμοιοι με εκείνους που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου και αποτελούν BMI> 28 kg/m², το γήρας, η παρουσία του διαβήτη τύπου II, η δυσλιπιδαιμία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξημένες τρανσαμινάσες, καθώς η NAFLD αποτελεί το ηπατικό μέρος του μεταβολικού συνδρόμου⁽⁵⁾.

Η διαίτα αποτελεί, επίσης, έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου. Συγκεκριμένα, η υπέρμετρη ενεργειακή πρόσληψη οδηγεί στην παχυσαρκία αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Επιπλέον, η πρόσληψη κορεσμένου λίπους, χοληστερόλης και η χαμηλή πρόσληψη διαιτητικών ινών και αντιοξειδωτικών έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο εμφάνισης NAFLD⁽⁶⁾. Ειδικότερα, έχει σημειωθεί η συσχέτιση της πρόσληψης φρουκτόζης τόσο με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου όσο και με την πρόοδο της ίνωσης σχετιζόμενη με την NASH⁽⁷⁾.

Ο επιπολασμός της NAFLD και της NASH έχει γνωρίσει μία αύξηση τα τελευταία 10 χρόνια παγκοσμίως, παράλληλα με την αύξηση της συχνότητας της παχυσαρκίας και των συνοδών μεταβολικών νοσημάτων. Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται στο 25,24% του παγκόσμιου πληθυσμού, αλλά υπάρχουν κάποιες φυλετικές διαφορές στην εμφάνιση της νόσου με τους Ανατολικούς πληθυσμούς να εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό εμφάνισης. Το ποσοστό των ασθενών με NAFLD που θα εμφανίσει NASH υπολογίζεται 5-10 % ^{(8),(9)}.

1.2 Παθοφυσιολογία της NAFLD και της NASH

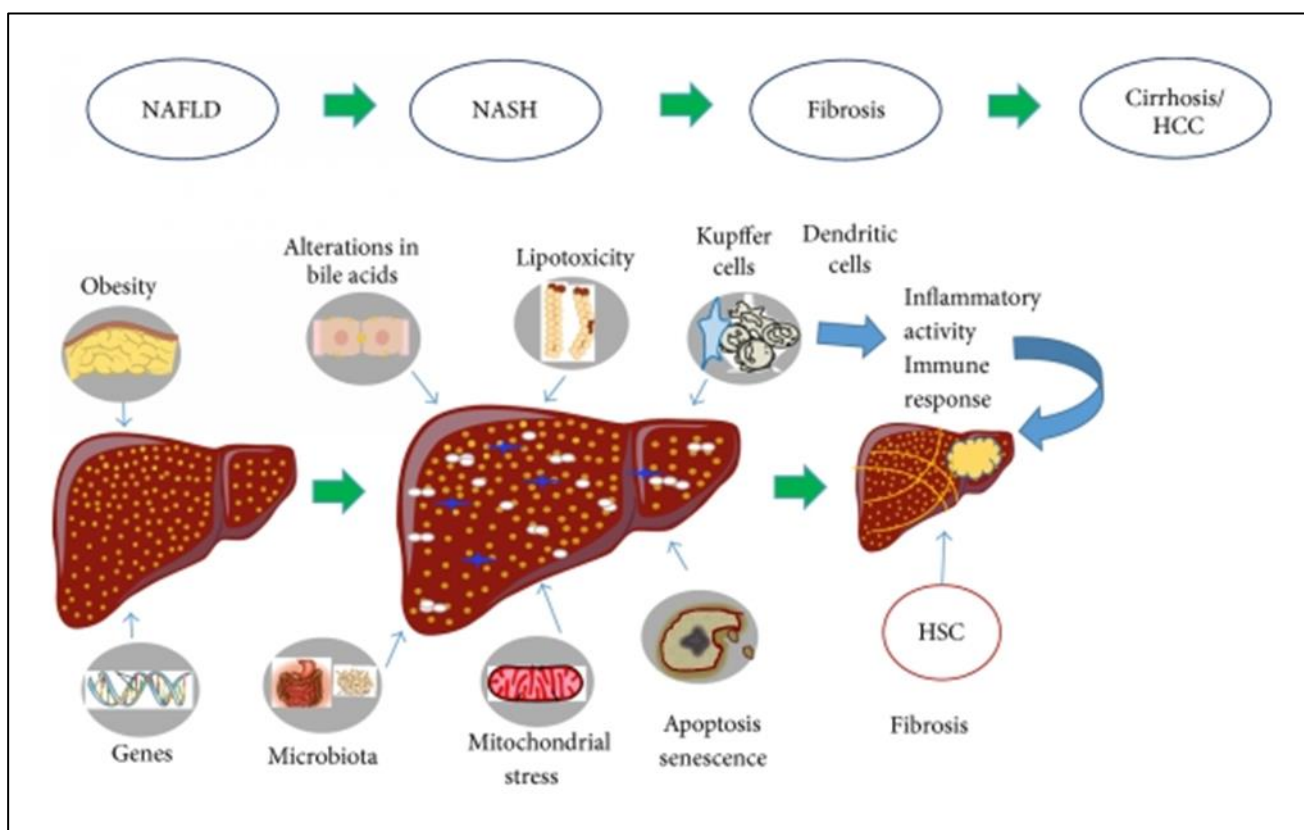
Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την εμφάνιση της NAFLD είναι πολύπλοκοι και δύσκολο να προσδιοριστούν και για αυτό έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις για την παθογένεση της νόσου. Η πρώτη υπόθεση για την ερμηνεία της παθογένεσης της νόσου ονομάστηκε υπόθεση δύο κτύπημάτων. Το πρώτο "κτύπημα" αποτελεί η συσσώρευση λιπαρών οξέων στον ηπατικό ιστό λόγω διαίτας, έλλειψης φυσικής δραστηριότητας και παχυσαρκίας και οδηγεί στην εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη που προάγει την στεάτωση. Έτσι, το ήπαρ ευαισθητοποιείται στην δράση διαφόρων παραγόντων που οδηγούν στο δεύτερο κτύπημα που αποτελεί το οξειδωτικό στρες, που προκύπτει από την αδυναμία διαχείρισης των ελεύθερων λιπαρών οξέων από τα μιτοχόνδρια, που τελικά οδηγεί σε βλάβες σε αυτά. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες στα κύτταρα και απόπτωση, αύξηση της παραγωγής προ-φλεγμονωδών

κυτταροκινών, στην δημιουργία ίνωσης και τραυματισμό του ήπατος, δηλαδή στην εγκαθίδρυση της NASH^{(10),(11)}.

Αυτή η υπόθεση εγκαταλείφθηκε καθώς υπήρξε πολύ απλοϊκή για να μπορέσει να εξηγήσει την διαδικασία παθογένεσης της NAFLD και αντικαταστάθηκε με την υπόθεση των πολλαπλών κτυπημάτων. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζει ότι πολύ διαφορετικοί παράγοντες δρουν παράλληλα και συνεργιστικά ώστε να εμφανιστεί η νόσος⁽¹²⁾.

1.2.1 Υπόθεση πολλαπλών κτυπημάτων

Εικόνα 2: Υπόθεση πολλαπλών κτυπημάτων για την εγκαθίδρυση και πρόοδο της NAFLD



1.2.1.1 Ελεύθερα λιπαρά οξέα και αντίσταση στην ινσουλίνη

Πιο συγκεκριμένα, η θεωρία αυτή λαμβάνει υπόψιν της παράγοντες όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, η γενετική προδιάθεση, το οξειδωτικό στρες και το μικροβίωμα. Θα εξετάσουμε αυτούς τους παράγοντες ξεχωριστά.

Η συσσώρευση λίπους με την μορφή τριακυλογλυκερολών στο ήπαρ συνήθως οφείλεται στην παχυσαρκία που οδηγεί σε εκτεταμένη λιπόλυση και δημιουργία FFA (free fatty acid) στην κυκλοφορία τα οποία εισέρχονται στο ήπαρ και οδηγούν σε στεάτωση, αυξημένη γλυκονεογένεση και λιπογένεση^{(13),(14)}. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ σχετίζονται με την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη,

μέσω ενεργοποίησης της κινάσης σερίνης⁽¹⁵⁾, προωθώντας έτσι την λιπόλυση καθώς η ινσουλίνη δρα μέσω της ορμονοευαίσθητης λιπάσης και αναστέλλει την λιπόλυση⁽¹⁶⁾.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων (60%) προέρχεται από μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα του πλάσματος, 25 % από de novo λιπογένεση και 15% από την τροφή μέσω των χυλομικρών⁽¹⁷⁾. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα έχουν και λιποτοξικές ιδιότητες στα ηπατοκύτταρα αφενός γιατί η υπερσυσσώρευση τους οδηγεί δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω της β-οξείδωσης⁽¹⁸⁾. Πέρα από αυτή την δράση το παλμιτικό, που αποτελεί ένα από τα πιο άφθονα ελεύθερα λιπαρά οξέα⁽¹⁹⁾ και η ελεύθερη χοληστερόλη μπορεί να ενεργοποιήσουν προ-φλεγμονώδη σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω ενεργοποίησης των παραγόντων JNK και NF-κΒ και να εντείνουν την φλεγμονή^{(20),(21)}. Η μετατροπή των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε τριγλυκερίδια ίσως να αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας του ήπατος έναντι της τοξικότητας των FFA⁽²²⁾.

1.2.1.2 Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Έχει αποδειχθεί η ύπαρξη συσχέτισης της αντίστασης στην ινσουλίνη, της παχυσαρκίας και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας⁽²³⁾. Αλλαγές στη δομή και στη λειτουργία των μιτοχονδρίων συνεισφέρουν στην παθογένεση της NAFLD, λόγω των βλαβών στην αναπνευστική αλυσίδα και στην β-οξείδωση των λιπαρών οξέων⁽²⁴⁾. Λόγω αυτών, τα μιτοχόνδρια δεν μπορούν να διαχειριστούν την αυξημένη εισροή λιπιδίων, γεγονός που καταλήγει στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), τοξικούς μεταβολίτες των λιπιδίων και άρση της ομοιόστασης του μεταβολισμού των λιπιδίων. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στην ενεργοποίηση των μοριακών μονοπατιών της φλεγμονής και περαιτέρω βλάβης στα ηπατοκύτταρα και στα μιτοχόνδρια⁽²⁵⁾.

1.2.1.3 Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου

Στην NAFLD και στην NASH έχει παρατηρηθεί μία μειωμένη ικανότητα του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) στην αναδίπλωση, επεξεργασία και επιδιόρθωση των πρωτεϊνών, ενώ οι πρωτεϊνικές ανάγκες λόγω της φλεγμονής είναι αυξημένες. Αυτή η ανισορροπία ως προς τις ανάγκες για αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στην μειωμένη ικανότητα του ΕΔ να τις ικανοποιήσει οδηγεί στην συσσώρευση μη λειτουργικών πρωτεϊνών που δεν έχουν αναδιπλωθεί ή έχουν αναδιπλωθεί λανθασμένα. Αυτό λόγω ανάδρασης οδηγεί στην απάντηση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (unfolded protein response). Παρατεταμένο ενδοπλασματικό στρες οδηγεί σε υπέρβαση της δράσης της UPR και τελικά σε κυτταρικό θάνατο⁽²⁶⁾. Επιπλέον το χρόνια ενδοπλασματικό στρες ευνοεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών και οδηγεί και αυτό σε φλεγμονή μέσω των μονοπατιών του NF-κΒ και της JNK κινάσης⁽²⁷⁾.

1.2.1.4 Δυσλειτουργία των λιποκυτταροκινών

Στην παχυσαρκία έχει παρατηρηθεί μία αύξηση της παραγωγής λιποκυτταροκινών που προάγουν την φλεγμονή όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η ιντερλευκίνη 8 (IL-8). Αυτή η αύξηση με τη σειρά της οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, σε άτομα με παχυσαρκία έχει παρατηρηθεί μία μείωση της παραγωγής αντιπονεκτίνης, μίας ορμόνης που προάγει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και έχει αντιφλεγμονώδεις δράσεις^{(28),(29)}.

1.2.1.5 Κύτταρα Kupffer

Τα κύτταρα Kupffer αποτελούν μακροφάγα που εδρεύουν στο ήπαρ και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να εκτελούν φαγοκυττάρωση και να καταστρέφουν παθογόνα που εισέρχονται μέσω της κυκλοφορίας στο ήπαρ, καθώς και να παρέχουν προστασία έναντι ξένων σωμάτων που εισέρχονται μέσω του γαστρικού συστήματος⁽³⁰⁾. Τα Kupffer μπορούν να μετατραπούν σε δύο μορφές την M1 και την M2. Τα κύτταρα M1 είναι υπεύθυνα για την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως είναι ο TNF-α και η IL-6 και τα M2 είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως η IL-1. Σε παχύσαρκα άτομα έχει παρατηρηθεί μία υψηλή παραγωγή ενδοτοξινών (LPS) από τα βακτήρια του εντέρου. Στην NASH/NAFLD η σύνδεση των LPS στον υποδοχέα TLR ενεργοποιεί την μετατροπή των Kupffer στην M1 μορφή συμβάλλοντας έτσι στην παρατεταμένη φλεγμονή που παρατηρείται κατά την νόσο⁽³¹⁾. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι οι δίαιτες υψηλές σε λίπος είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν τα M1 Kupffer κύτταρα⁽³²⁾. Επιπρόσθετα, ο M1 υπότυπος μπορεί να προκαλέσει στεάτωση μέσω της αυξημένης δραστηριότητας της τρανσφοράσης των διάκυλογλυκερόλης που προκαλεί^{(33),(34)}.

1.2.1.6 Διαιτητικοί παράγοντες

Ο πρωτεύων διαιτητικός παράγοντας που έχει συσχετιστεί με την νόσο είναι οι δίαιτες υψηλών θερμίδων. Το συγκεκριμένο διαιτητικό μοτίβο έχει συσχετιστεί με την NAFLD και την στεάτωση τόσο μέσω της υπερτροφίας του λιπώδους ιστού που δημιουργεί με την εναπόθεση λίπους, όσο και την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη λόγω της αύξησης των FFA στην κυκλοφορία⁽³⁵⁾.

Ο μονοσακχαρίτης φρουκτόζη έχει αποδειχθεί ότι επάγει την αντίσταση στην ινσουλίνη στο ήπαρ όπου είναι και το σημείο του μεταβολισμού της⁽³⁶⁾. Εκεί μετατρέπεται σε φωσφορική-1 φρουκτόζη και στη συνέχεια σε φωσφορική τριόζη, η οποία εισέρχεται στον γλυκολυτικό κύκλο και παράγει υποστρώματα για de novo λιπογένεση, η οποία οδηγεί σε εναπόθεση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα⁽³⁷⁾. Επιπλέον, η φρουκτόζη αποτελεί προ-φλεγμονώδη παράγοντα που δημιουργεί οξειδωτικό στρες και αυξάνει τα επίπεδα του TNF-α. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν συσχετίσει την έγχυση φρουκτόζης σε ασθενείς με NAFLD με αυξημένα επίπεδα ίνωσης⁽³⁸⁾.

Οι δίαιτες με υψηλή ποσότητα λιπαρών έχουν επίσης συσχετιστεί με την ηπατική στεάτωση και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Πιο συγκεκριμένα, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προωθούν την ανάπτυξη στεάτωσης και φλεγμονής⁽³⁹⁾. Αντιθέτως τα πολυακόρεστα και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και δρουν προστατευτικά έναντι της ανάπτυξης της νόσου⁽⁴⁰⁾.

1.2.1.7 Επίδραση της μικροχλωρίδας του εντέρου

Έχει παρατηρηθεί στους ασθενείς με NAFLD ότι έχουν μεγαλύτερη διαπερατότητα εντέρου και υπερπολλαπλασιασμό των εντερικών βακτηρίων σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό⁽⁴¹⁾. Ο συνδυασμός αυτών των δύο έχει ως αποτέλεσμα την επίδραση τοξινών και συγκεκριμένα των LPS που παράγονται από τα βακτήρια στο λεπτό έντερο, διαπερνούν το επιθήλιο και τελικά δρουν στο ήπαρ. Δρουν μέσω της σύνδεσής του στον συν υποδοχέα CD14 ως συνδέτες των TLR υποδοχέων, που οδηγούν σε ενεργοποίηση μονοπατιών της φλεγμονής, όπως αυτά των JNK, p38, NF-κB, προάγοντας την εμφάνιση οξειδωτικού στρες και αντίστασης στην ινσουλίνη, καθώς και παχυσαρκίας⁽⁴²⁾. Επιπλέον, ο πολλαπλασιασμός άνω του φυσιολογικού των βακτηρίων οδηγεί σε υπέρμετρη παραγωγή λιπαρών οξέων μικρής αλύσου SCFA, που συνεισφέρουν στην παραγωγή ενέργειας και την παχυσαρκία⁽⁴³⁾. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η μετατροπή της διαιτητικής χολίνης σε μεθυλαμίνη. Αυτή η ουσία είναι τοξική λόγω των προ-φλεγμονωδών της χαρακτηριστικών, καθώς και γιατί μειώνονται τα φυσιολογικά επίπεδα χολίνης, που είναι απαραίτητη για την σύνθεση της VLDL και η έλλειψή της έχειδειχθεί ότι οδηγεί σε στεάτωση⁽⁴⁴⁾. Επιπλέον, τα LPS οδηγούν στην μετατροπή των Kupffer μακροφάγων στον προ-φλεγμονώδη M1 υπότυπο όπως αναλύθηκε σε παραπάνω ενότητα.

1.2.1.8 Ηπατικά αστρικά κύτταρα

Τα ηπατικά αστρικά κύτταρα (Hepatic Stellate Cells, HSC) αποτελούν το 5-8 % των κυττάρων του ήπατος και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η αποθήκευση της βιταμίνης Α μέσα σε λιπιδικές σταγόνες που έχουν στο εσωτερικό τους, σε αυτή την μορφή είναι σε ηρεμία⁽⁴⁵⁾. Σε περίπτωση τραυματισμού του ιστού, γεγονός που συμβαίνει στην NASH και στην NAFLD λόγω αυξημένης απόπτωσης, κυτταρικής δυσλειτουργίας και παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου, τα ηπατικά αστρικά κύτταρα ενεργοποιούνται και υπόκεινται σε μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές. Αυτές οι αλλαγές προσδίδουν στα HSC την ιδιότητα υπερπαραγωγής και έκκρισης των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, δηλαδή κυρίως κολλαγόνο και γλυκοπρωτεΐνες, και άρα στην δημιουργία ινώδους ιστού⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾. Τα δύο μόρια που έχουν μελετηθεί περισσότερο για την επαγωγή της ενεργοποίησης των HSC είναι ο PDGF και ο TNF-β. Η δημιουργία ινώδους ιστού τελικά οδηγεί σε έκπτωση της φυσιολογικής ηπατικής ανατομίας και λειτουργίας⁽⁴⁸⁾.

1.2.1.9 Γενετικοί παράγοντες

Η NAFLD αποτελεί μία κοινή νόσο και για αυτό πολλοί συχνοί πολυμορφισμοί σε γονίδια έχουν αναδειχθεί μέσω GWAS μελετών να εμπλέκονται στην παθογένεσή της. Οι πολυμορφισμοί που έχουν επιβεβαιωθεί από τις περισσότερες μελέτες αποτελούν αυτοί στα γονίδια PNPLA3 και TM6SF2.

Το γονίδιο της περιοχής που περιέχει φωσφολιπάση πατατίνη 3 ή PNPLA3 κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πολυπεπτιδική αλυσίδα με δραστικότητα υδρολάσης. Εκφράζεται στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και στις λιπιδικές μεμβράνες των ηπατοκυττάρων και των λιποκυττάρων. Έχει δράση εστεράσης της ρετινόλης και επιτρέπει έτσι την εξωκυττάρωση της ρετινόλης. Το γονίδιο της PNPLA3 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22 και ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs738409c.444 C>G, p. I148M είναι μία μη συνώνυμη αντικατάσταση κυτοσίνης σε γουανίνη, που οδηγεί σε μία μετατροπή μια ισολευκίνης σε μεθειονίνης στο κωδικόνιο 148. Αυτή η μετάλλαξη έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα λίπους στο ήπαρ, καθώς και με αυξημένη ηπατική φλεγμονή και ίνωση. Ειδικότερα, οι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έχουν 73% περισσότερο λιπιδικό περιεχόμενο και 3.2 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ίνωσης και φλεγμονής σε σχέση με τα άτομα που δεν έχουν την μετάλλαξη. Οι επιδράσεις της συγκεκριμένης μετάλλαξης είναι ανεξάρτητες της παχυσαρκίας, της ινσουλινοαντίστασης και του διαβήτη, γεγονός που καταδεικνύει το σημαντικό της ρόλο στην εμφάνιση και στην πρόοδο της νόσου⁽⁴⁹⁾.

Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στο γονίδιο TM6SF2 ή μέλος της υπεροικογένειας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών αποτελεί έναν σημαντικό γενετικό παράγοντα που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης NAFLD. Πρόκειται για τον πολυμορφισμό rs58542826 (c.449 C>T) δηλαδή μία μη συνώνυμη αντικατάσταση θυμίνης σε κυτοσίνη στον γενετικό τόπο 19p13.11 μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου TM6SF2 οδηγεί σε μία αντικατάσταση γλουταμινικού σε λυσίνη E167K. Στα άτομα με τον πολυμορφισμό έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών αλανίνης και ασπαρτάμης, καθώς και μειωμένα επίπεδα χαμηλής πυκνότητας λιπο-πρωτεΐνης (LDL) και τριγλυκεριδίων (TG's). Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η λειτουργία της TM6SF2 πρωτεΐνης αφορά την έκκριση τριγλυκεριδίων από το ήπαρ και η μειωμένη λειτουργικότητα της επιδρά στην εμφάνιση NAFLD, στον κίνδυνο ανάπτυξης ίνωσης και NASH^{(50),(51)}.

Τα υπόλοιπα γονίδια που έχει αποδειχθεί ότι συμβάλουν στην ανάπτυξη της νόσου δρουν μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, τον μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων, το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή⁽⁵²⁾. Πολυμορφισμοί των γονιδίων

ENPP1(rs104498, K121Q) και του γονιδίου του υποστρώματος-1 του υποδοχέα της ινσουλίνης IRS1(rs1801278, Q972R) οδηγούν σε διαταραχή της σηματοδότησης του υποδοχέα της ινσουλίνης και σε αντίσταση στην ινσουλίνη, καθώς συσχετίστηκαν με υψηλότερα επίπεδα ίνωσης που σχετίζεται με την NAFLD⁽⁵³⁾. Ο πολυμορφισμός της ρυθμιστικής πρωτεΐνης της γλυκοκινάσης (GCKR) (rs1260326 P446L) έχει συσχετιστεί με την NAFLD από μελέτες GWAS. Ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι να αναστέλλει την δράση της γλυκοκινάσης όταν ενεργοποιείται από την φωσφορική-6 φρουκτόζη και οδηγεί έτσι σε αυξημένη γλυκόλυση και απορρόφηση γλυκόζης από το ήπαρ. Αυτό, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα malonyl-CoA λόγω πτώσης των επιπέδων γλυκόζης, που τελικά χρησιμοποιείται στην παραγωγή λιπών και οδηγεί σε στεάτωση⁽⁵⁴⁾. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο του μεταφορέα της γλυκόζης SLC2A1 έχουν επίσης συσχετιστεί με την νόσο⁽⁵⁵⁾.

Ως προς τον μεταβολισμό των λιπιδίων, μεταλλάξεις στο γονίδιο και στον υποκινητή της μικροσωμικής μεταφορικής πρωτεΐνης τριγλυκεριδίων έχουν συσχετιστεί με προχωρημένου βαθμού στεάτωση και ίνωση στο ήπαρ. Οι πολυμορφισμοί στον υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη C rs2854116(-455 C>T) και rs2854117(-482 C>T) έχουν συσχετιστεί με τον βαθμό της στεάτωσης⁽⁵⁶⁾.

Καθώς το οξειδωτικό στρες συντελεί στην εμφάνιση και στην ανάπτυξη της νόσου, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην παραγωγή ή στην αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης ή πρόοδο της νόσου. Μεταλλαγές του γονιδίου της αιμοχρωμάτωσης (HFE), συγκεκριμένα οι SNP's C282Y (rs1800562) και H63D (rs1799945) έχουν συσχετιστεί με την NAFLD αλλά δεν επιβεβαιώνεται από όλες τις μελέτες⁽⁵⁷⁾. Ο ομόζυγος πολυμορφισμός rs4880 του γονιδίου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου 2 (SOD2) έχει συσχετιστεί με 1.56 μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης προχωρημένου σταδίου ίνωσης σε σχέση με άτομα με φυσιολογικά αλληλόμορφα⁽⁵⁸⁾. Επιπλέον, πολυμορφισμοί στα γονίδια GCLC και GCLM που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της συνθετάσης της γλουταμυλοκυστεΐνης-γ, που αποτελεί ένζυμο απαραίτητο για τη σύνθεση γλουταθειόνης ενός τριπεπτιδίου με αντιοξειδωτική δράση, συσχετίστηκαν με την πρόοδο της στεατοηπατίτιδας⁽⁵⁹⁾.

Η παρουσία φλεγμονής και ίνωσης αποτελούν αίτια και αποτελέσματα της προόδου της νόσου και ειδικότερα της εξέλιξης της NASH και λόγω αυτού μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με αυτές τις διεργασίες είναι επακόλουθο να επηρεάζουν την πορεία της νόσου. Πολυμορφισμοί στα γονίδια κυτταροκινών και ειδικότερα στην ιντερλευκίνη 1 β (IL1B), στον

υποκινητή του TNF και στο γονίδιο του αντιγόνου-4 των Τ λεμφοκυττάρων έχουν συσχετιστεί με την NAFLD. Ο πολυμορφισμός rs12979860 του ψευδογονιδίου της ιντερφερόνης λάμδα 4 (IFNL4) συσχετίστηκε με ίνωση που οφείλεται στην ύπαρξη NAFLD και ένας πολυμορφισμός στην θέση (-174 G>C), στην περιοχή του ενισχυτή του γονιδίου της IL6, συσχετίστηκε με την NASH. Τέλος, ένας πολυμορφισμός στο εσώνιο του γονιδίου του σχετικού με τον Kruppel παράγοντα (KLF6) προωθεί το εναλλακτικό μάτισμα του KLF6 και οδηγεί στην δημιουργία μία παραλλαγής του γονιδίου που σχετίζεται με μειωμένη ίνωση σε ασθενείς με NAFLD. Άλλα γονίδια, που μπορεί να σχετίζονται με την NAFLD αλλά χρήζουν επιβεβαίωσης από μελέτες, είναι γονίδια που σχετίζονται με την ίνωση όπως αυτό του κολλαγόνου 1 και της μεταλλοπρωτεΐνης-3 πλέγματος (MMP3)⁽⁵²⁾.

1.2.1.10 Επιγενετικοί παράγοντες

Οι επιγενετικές αλλαγές αποτελούν διαφοροποιήσεις σε επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων που επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση και τον φαινότυπο. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται κυρίως σε χημικές τροποποιήσεις των ιστονών ή των βάσεων του DNA, καθώς και στη δράση RNA μικρού μήκους, που απενεργοποιούν τα παραγόμενα RNA και ονομάζονται microRNAs. Στη συγκεκριμένη ενότητα, θα αναφερθούμε και στους δύο επιγενετικούς μηχανισμούς, αλλά ο ρόλος των microRNAs στην ανάπτυξη της NAFLD και στην πρόοδο της στη NASH θα αναλυθεί περαιτέρω σε επόμενη ενότητα.

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μία διαδικασία κατά την οποία γίνεται η εισαγωγή μίας μεθυλομάδας(-CH₃) σε βάσεις κυτοσίνης στην ακολουθία του DNA. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη δράση των ενζύμων μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs), που συνδέουν μία μεθυλομάδα στα νουκλεοτίδια που έχουν βάση κυτοσίνη και ακολουθούνται από νουκλεοτίδια που έχουν ως βάση την γουανίνη και ονομάζονται σημεία CpGs. Η υπερμεθυλίωση του DNA έχει συνδεθεί με γενετική αποσιώπηση ενώ η υπομεθυλίωση με την έκφραση γονιδίων. Στον άνθρωπο η μεθυλίωση του μιτοχονδριακού γονιδίου της δευδροξυγενάσης 6 του NADH (MT-ND6) είναι αυξημένη στους ασθενείς με NASH σε σχέση με αυτούς με απλή στεάτωση, καθώς και ο λόγος του μεθυλιωμένου/μη-μεθυλιωμένου DNA για το ίδιο γονίδιο έχει συσχετιστεί με σκορ της δραστηριότητας του NAFLD⁽⁶⁰⁾. Επίσης, η μεθυλίωση στον ενισχυτή του συνενεργοποιητή 1 άλφα του PPARγ (PGC1-α) έχει συσχετιστεί με αντίσταση στην ινσουλίνη, και ο λόγος μεθυλιωμένου/μη-μεθυλιωμένου DNA για το ίδιο γονίδιο έχει συσχετιστεί με το τεστ για την ινουλinoαντίσταση HOMA-IR και με την γλυκόζη νηστείας⁽⁶¹⁾. Η μεθυλίωση του

γονιδίου αυτού παρατηρήθηκε υψηλότερη σε άτομα με NAFLD συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό.

Διαφορές στην μεθυλίωση των γονιδίων μπορούν να διαχωρίσουν ασθενείς με προχωρημένη NASH από ασθενείς με απλή στεάτωση, καθώς παρατηρήθηκαν διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης σε 69.247 σημεία CpG από τα οποία το 76% ήταν υπομεθυλιωμένα και τα 24% υπερμεθυλιωμένα σε ασθενείς με NASH συγκριτικά με άτομα με απλή στεάτωση. Επιπλέον, έχει βρεθεί μειωμένη μεθυλίωση γονιδίων που προάγουν την ίνωση, όπως ο TGFβ1 παράγοντας καθώς και αυξημένη μεθυλίωση σε γονίδια με δράση ενάντια στην ίνωση, όπως το γονίδιο του PPARα σε άτομα με προχωρημένου βαθμού NAFLD σε σχέση με άτομα που ήταν σε πρώιμο στάδιο της νόσου⁽⁶²⁾. Τα παραπάνω καταδεικνύουν την πιθανή χρησιμότητα των επιπέδων μεθυλίωσης στην πρόβλεψη της έκβασης της NAFLD σε NASH, καθώς και την ανάδειξη του ρόλου της μεθυλίωσης στην ανάπτυξη της νόσου.

Οι χημικές τροποποιήσεις των ιστονών, που επηρεάζουν κυρίως την δομή και την διαθεσιμότητα της χρωματίνης στην σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων, είναι οι ακετυλίωσεις και οι αποακετυλίωσεις. Η ακετυλίωση των ιστονών πραγματοποιείται λόγω της δράσης των ενζύμων ακετυλοτρανσφερασών ιστονών (HATs) ενώ η αποακετυλίωση πραγματοποιείται λόγω της δράσης των ενζύμων αποακετυλασών ιστονών (HDACs). Στην NAFLD έχει βρεθεί αυξημένη ενεργότητα της p300, μίας ακυλοτρανσφεράσης που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση φλεγμονωδών μονοπατιών. Συγκεκριμένα, η p300 αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ChREBP, που με τη σειρά του εμπλέκεται στην έκφραση γονιδίων που προάγουν την λιπογένεση στο ήπαρ, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της νόσου⁽⁶³⁾.

Οι αποακετυλάσες έχουν επίσης επίδραση στην εμφάνιση της νόσου και κυρίως οι σιρτουίνες, που αποτελούν μέλη της ομάδας III των αποακετυλασών. Ειδικότερα, η σιρτουίνη 1 (SIRT1) αναστέλλει την δράση του NF-κΒ και την φλεγμονώδη απόκριση και έτσι δρα προστατευτικά σε καταστάσεις όπως ο διαβήτης και η στεάτωση στο ήπαρ, όπου η ύπαρξη φλεγμονής συμμετέχει στην εμφάνισή τους⁽⁶⁴⁾. Η σιρτουίνη 3 έχει ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων και στον μιτοχονδριακό μεταβολισμό και πολυμορφισμοί στο γονίδιό της έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη της NAFLD⁽⁶⁵⁾.

1.3 MicroRNAs-MicroRNA 21

1.3.1 Λειτουργίες, Χαρακτηριστικά και βιογένεση των microRNA

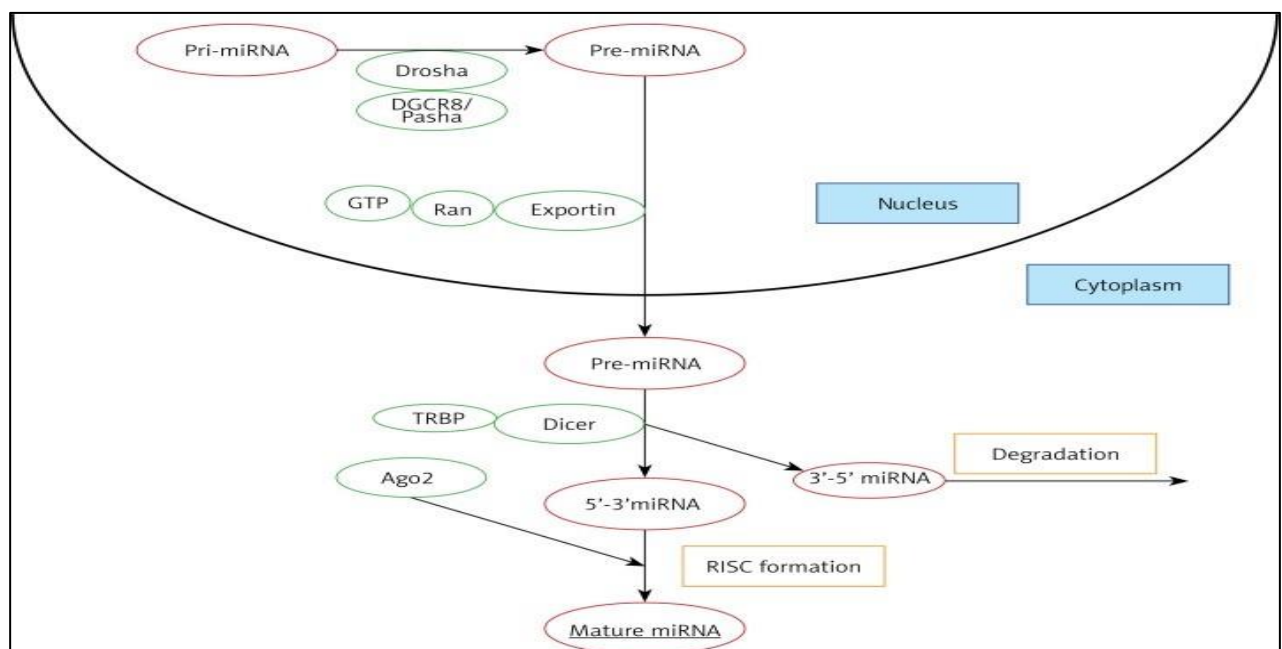
Τα microRNAs ή miRNAs αποτελούν μικρού μήκους, συνήθως 21-25 νουκλεοτιδίων μη-κωδικά μόρια RNA. Είναι μονόκλωνα και προκύπτουν από πρόδρομα μόρια που έχουν σχήμα φουρκέτας. Το πρώτο miRNA ανακαλύφθηκε το 1993 στον *C. Elegans* και ονομάστηκε lin-4⁽⁸⁰⁾ και από τότε έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 1900 γονίδια microRNAs, σύμφωνα με την miRbase, στον άνθρωπο και ρυθμίζουν την έκφραση 30% του συνόλου του ανθρώπινου γονιδιώματος⁽⁸¹⁾.

Τα γονίδια των microRNAs βρίσκονται κυρίως σε περιοχές ανάμεσα των γονιδίων και στα εσώνια γονιδίων⁽⁸²⁾ και συνήθως βρίσκονται σε κοντινές περιοχές του γονιδιώματος και τείνουν να εκφράζονται μαζί ως πρόδρομα μετάγραφα, ενώ άλλα μπορούν να μεταγράφονται και αυτόνομα^{(83),(84)}. Ομαδοποιούνται ανάλογα με την θέση τους στο γονιδίωμα ως ιντρονικά miRNAs σε κωδικές περιοχές (TU transcription units), ιντρονικά miRNA σε μη κωδικές περιοχές, εξονικά miRNA σε κωδικές περιοχές και εξωνικά miRNA σε μη κωδικές περιοχές.

Τα microRNAs στα ζώα εκφράζονται κυρίως μέσω της δράσης της RNA πολυμεράσης II, ενώ ένας μικρός αριθμός τους μέσω της δράσης της RNA πολυμεράσης III. Τα προϊόντα της έκφρασης των γονιδίων των microRNA ονομάζονται πρωταρχικά miRNA ή primary miRNA ή pri-miRNA και έχουν δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια, ακολουθεί επεξεργασία του pri-miRNA στον πυρήνα με τη δράση της πρωτεΐνης Drosha, που για την δράση της απαιτεί την παρουσία του συμπαραγόντα DCGR8 (DiGeorge syndrome critical region in gene 8). Η τομή στον κορμό της φουρκέτας από τη δράση της Drosha δημιουργεί ένα μόριο 60-70 νουκλεοτιδίων που έχει με τη σειρά του δομή φουρκέτας και ονομάζεται πρόδρομο miRNA ή precursor miRNA ή pre-miRNA. Ακολουθεί μεταφορά του pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα, μια διαδικασία που πραγματοποιείται μέσω της μεταφοράς των pre-miRNAs μέσω των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων, που συνιστούν πρωτεϊνικά κανάλια που διαπερνούν την πυρηνική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, η μεταφορά των pri-microRNAs γίνεται μέσω του πυρηνικού μεταφορικού υποδοχέα που εξαρτάται από τον Ran-GTP εξπορτίνη 5 ή EXT5. Η σύνδεση με την EXP5 γίνεται μέσω της αναγνώρισης του βρόγχου RNA διπλής έλικας στην 3' προεξοχή του pre-miRNA και σύνδεσης της με αυτόν, καθώς και με τον συμπαραγόντα Ran με την επακόλουθη μεταφορά του pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα και απελευθέρωσής του μέσω της υδρόλυσης ενός GTP.

Στο κυτταρόπλασμα ολοκληρώνεται η διαδικασία της ωρίμανσης των miRNAs μέσω της δράσης της πρωτεΐνης Dicer, μίας RNase III. Η Dicer δρα συνεργιστικά με άλλες πρωτεΐνες για την επίτευξη της ωρίμανσης των miRNA's, που στον άνθρωπο αποτελούν οι πρωτεΐνες της οικογένειας αργοναυτών ή Ago, καθώς και τις πρωτεΐνες TRBP και PRKARA ή PACT. Η διαδικασία που ακολουθείται για την ωρίμανση περιλαμβάνει την δημιουργία ενός διπλού miRNA λόγω της αποκοπής της δομής φουρκέτας από την Dicer και η ενσωμάτωσή του σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών Ago. Η μία έλικα του miRNA διασπάται αφού η διπλή έλικα αποσυναρμολογείται από μία ελικάση και η άλλη παραμένει συνδεδεμένη με το σύμπλοκο Ago ως ώριμο miRNA. Η Dicer συνδέεται με τις TRBP και PACT πρωτεΐνες σχηματίζοντας το σύμπλοκο φόρτωσης στο RISC ή RLT. Τελικά, το ώριμο μονόκλωνο miRNA μαζί με το σύμπλεγμα Ago την Dicer και τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την δράση της σχηματίζουν το σύμπλοκο σίγασης μέσω RNA ή RNA-induced silencing complex ή RISC, το οποίο αναγνωρίζει, μέσω ομολογίας βάσεων του miRNA, τα mRNA που θα απενεργοποιήσει .

Εικόνα 3: Βιογένεση των miRNAs

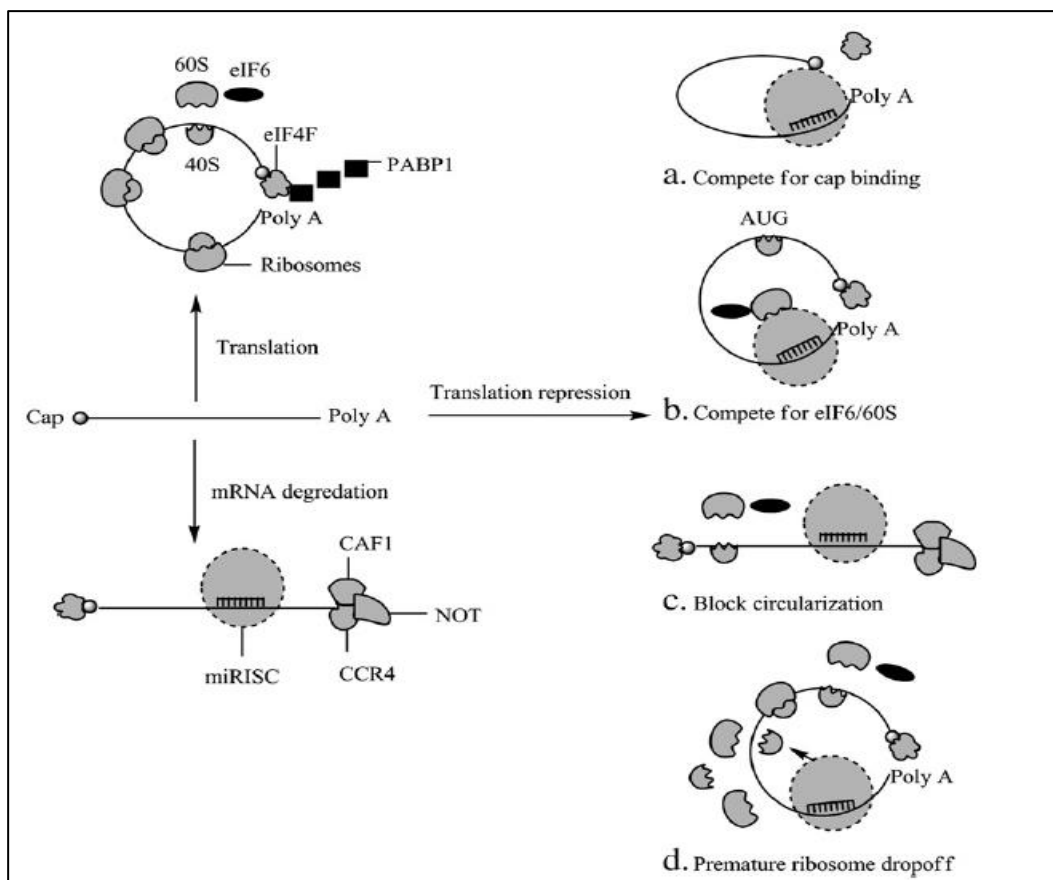


1.3.2 Δράση miRNA's

Τα miRNAs έχουν, ως σύμπλοκο RISC, ρόλο στην γονιδιακή έκφραση μέσω της απενεργοποίησης των μεταφορικών RNA(messenger RNA ή mRNA) πριν μεταφραστούν σε πρωτεΐνες. Τα miRNAs αναγνωρίζουν τα mRNA στόχους τους, μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων στην 3' UTR (αμετάφραστη περιοχή) του mRNA και ανάλογα με τον βαθμό της συμπληρωματικότητας μεταξύ του miRNA με το mRNA η απενεργοποίηση των mRNA γίνεται με δύο διαφορετικούς

μηχανισμούς. Όταν υπάρχει υψηλή συμπληρωματικότητα η απενεργοποίηση πραγματοποιείται μέσω της δράσης των Ago, που αποκόπτουν το mRNA, ενώ εάν υπάρχει ανομοιότητα στο ταίριασμα των βάσεων, η απενεργοποίηση των mRNA γίνεται μέσω του μηχανισμού της μεταφραστικής καταστολής.

Παρότι ο μηχανισμός της μεταφραστικής καταστολής δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, έχουν προταθεί τέσσερις μηχανισμοί με τους οποίους τα miRNA, που δρουν ως σύμπλοκο miRISK μπορούν να καταστείλουν την έκφραση των mRNA, εμποδίζοντας την μετάφραση τους. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, το σύμπλοκο miRISK συνδέεται στην 5' καλύπτρα του mRNA ανταγωνίζοντας την σύνδεση του με το σύμπλοκο eIF4F, που είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει η διαδικασία της έναρξης της μετάφρασης και της σύνδεσης με το ριβόσωμα. Σύμφωνα με τον δεύτερο προτεινόμενο μηχανισμό, τα miRNA εμποδίζουν την μετατροπή του mRNA σε κυκλικό μόριο, διαδικασία που εμποδίζει την περαιτέρω μετάφραση. Ο τρίτος μηχανισμός προτείνει ότι η δράση του miRISK γίνεται μέσω της αναστολής του σχηματισμού των ριβοσωμάτων, μέσω της παρεμπόδισης της σύνδεσης της 60S υπομονάδας με την 40 S. Τέλος, ο τέταρτος μηχανισμός προτείνει την συσσώρευση των mRNA σε σωμάτια επεξεργασίας μη επιτρέποντας έτσι την μετάφραση τους, μια διαδικασία που κατευθύνεται από τα miRNA.



Εικόνα 4: Διαφορετικοί τρόποι ρύθμισης της έκφρασης των mRNA από τα miRNA

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα miRNA ως σύμπλοκο miRISC συνδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNA μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων κατά Watson και Crick και επιστρατεύουν την δράση της πρωτεΐνης Ago2, η οποία κόβει τα mRNA και τα απενεργοποιεί⁽⁸⁵⁾.

1.3.3 Ο ρόλος των miRNA στην NAFLD

Η έκφραση των microRNAs έχει φανεί διαταραγμένη σε μοντέλα πειραματόζων^{(66),(67)} και σε ασθενείς με NAFLD και NASH⁽⁶⁸⁾ και αποτελεί ένδειξη του ρόλου τους στην παθολογία και στην φυσιολογία των δύο αυτών νόσων.

Το miRNA-122 αποτελεί το 70-80% του συνόλου των miRNAs που εκφράζονται στο ήπαρ και ο ρόλος και η έκφρασή του στην NAFLD και στη NASH έχει μελετηθεί εκτενώς. Το miRNA-122 εμπλέκεται στον μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω της σίγασης γονιδίων, όπως είναι τα FASN ACC2 ALCY, πιθανώς μέσω του ελέγχου της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων που τα ενεργοποιούν. Τα επίπεδα του microRNA 122 είναι μειωμένα σε ασθενείς με NASH στο ήπαρ, ενώ αυξάνονται στην κυκλοφορία πιθανόν λόγω μεταφοράς του. Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα πειραμάτων σε ποντίκια όπου είχε πραγματοποιηθεί σίγασή του, όπου φάνηκε η ανάπτυξη στεατοηπατίτιδας, ίνωσης στο ήπαρ⁽⁶⁹⁾ καταδεικνύουν τον ρόλο του στην εμφάνιση της νόσου. Ένα ακόμη miRNA που έχει μελετηθεί εκτενώς για τον ρόλο του στην NAFLD και στην NASH, αποτελεί το miRNA 155 που εμπλέκεται στον έλεγχο μονοπατιών της φλεγμονής. Αναστολή της έκφρασης του miRNA 155 σε μοντέλα ποντικών με στεατοηπατίτιδα είχαν μειωμένη στεάτωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου⁽⁷⁰⁾, αν και αυτό το αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώνεται από όλες τις μελέτες. Υπάρχει συνολικά μία διαφορά στα επίπεδα πολλών miRNA τόσο στο ήπαρ όσο και στην κυκλοφορία στην NAFLD και στη NASH και αυτό καταδεικνύει την μεγάλη εμπλοκή τους στην παθογένεση της νόσου⁽⁷¹⁾.

1.3.3 Η δράση του MiRNA 21 και ο ρόλος του στην ανθρώπινη παθολογία

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί το miRNA-21 ανακαλύφθηκε το 2001 από την ερευνητική ομάδα της Lagos-Quintana⁽⁸⁶⁾ και από τότε έχει μελετηθεί η δράση του για πολλές παθήσεις του ανθρώπου και κυρίως για τον ρόλο του στον καρκίνο.

Έχει δύο διαφορετικές ώριμες ακολουθίες την hsa-miR-21-3p και την hsa-mir21-5p (mirbase.org). Η αλληλουχία του γονιδίου του, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στον γενετικό τόπο 17q23 και έχουν βρεθεί τρεις αλληλουχίες υποκινητή ανοδικά της αλληλουχίας του γονιδίου του όπου, η τρίτη περιοχή έχει μικρή επικάλυψη με τις άλλες δύο και

έτσι πιθανόν δρα και ρυθμίζεται ανεξάρτητα με αυτές^{(87),(88),(89)}. Επιπλέον, έχουν βρεθεί και άλλες περιοχές ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου του miRNA21 με θετική ή αρνητική ρύθμιση⁽⁹⁰⁾.

1.3.3.1 miRNA 21 και καρκίνος

Το miRNA-21 έχει μελετηθεί εκτενώς για το ρόλο του στην καρκινογένεση καθώς έχει χαρακτηριστεί και ως ογκό-mir δηλαδή miRNA που η έκφραση του και τα γονίδια που σιγάει σχετίζονται με τον καρκίνο. Ειδικότερα, αποτελέσματα μελετών in vivo και in vitro δείχνουν ότι η έκφραση του miRNA είναι τροποποιημένη σε πολλά είδη καρκίνων όπως ο γαστρικός καρκίνος, ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος του μαστού, του πρωκτού, ήπατος κ.α.⁽⁹¹⁾⁻⁽⁹⁶⁾. Η δράση του miRNA στην ογκογένεση και στην προαγωγή της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων έγκειται στην ικανότητα του να σιγάει την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την απόπτωση, αναστέλλοντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο και επάγοντας την κυτταρική επιβίωση που μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων αποτελούν τα PDCD4, TPM1, PTEN, Bcl-2, RECK που η απενεργοποίησή τους σχετίζεται τόσο με την αναστολή της απόπτωσης όσο και με την προαγωγή των όγκων⁽⁹⁷⁾⁻⁽¹⁰⁴⁾. Δεδομένα μελετών υποστηρίζουν ότι η έκφραση του miRNA21 αυξάνεται με την πρόοδο και την ανάπτυξη των όγκων και αυτό ίσως το καταστήσει ως ένα προγνωστικό δείκτη για την έκβαση της νόσου^{(105),(106)}.

1.3.3.2 Ο ρόλος του miRNA-21 στην φλεγμονή και στην NAFLD/NASH

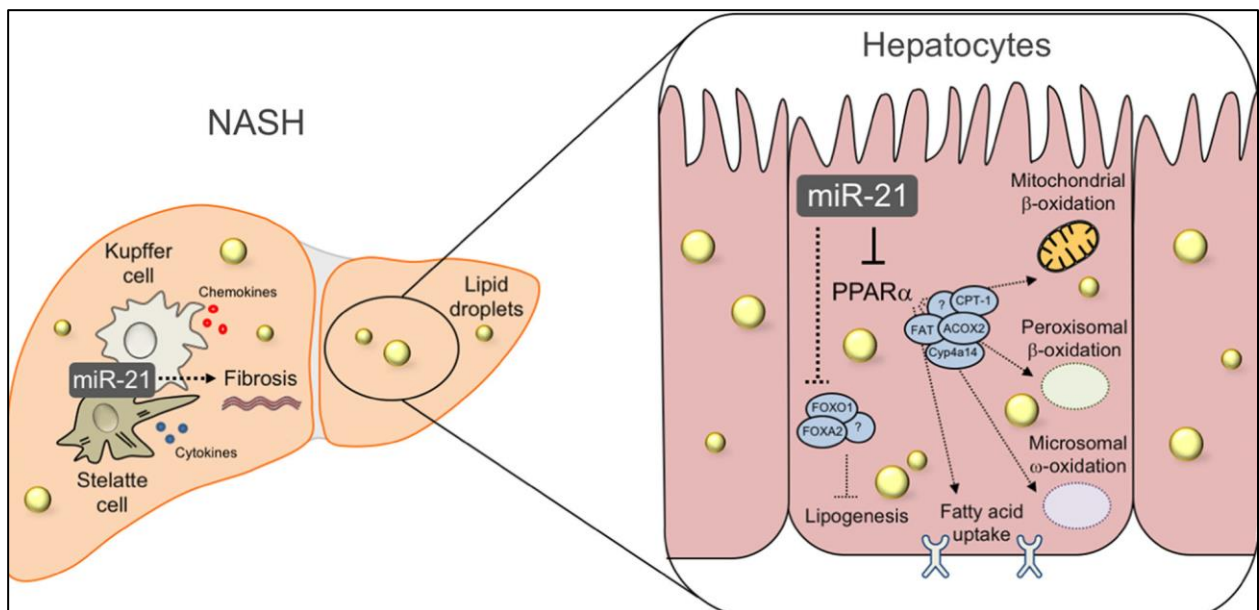
Οι πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους το miRNA-21 εμπλέκεται στην παθογένεση της NAFLD και την πρόοδό της στην NASH είναι αντικείμενο πολλών μελετών και μέχρι σήμερα έχουν περιγράψει μηχανισμοί που σχετίζονται με την φλεγμονή, την ίνωση και την συσσώρευση λίπους.

Αρχικά, τα επίπεδα του miRNA-21 έχουν βρεθεί αυξημένα μετά την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ ο οποίος ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του miRNA-21 και επάγει την μεταγραφή του⁽¹⁰⁷⁾. Το miRNA21, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έχει ως στόχο την πρωτεΐνη PTEN. Αυτή η πρωτεΐνη έχει ως ρόλο την αναστολή της φωσφορυλίωσης της AKT, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ και στην έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων⁽¹⁰⁸⁾.

Ο NF-κΒ αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, που ενεργοποιείται μέσω της σηματοδότησης των TLR υποδοχέων, που αναγνωρίζουν τα LPS, και της σηματοδότησης των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και η ενεργοποίησή του έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση προ-φλεγμονωδών

κυτταροκινών και χημειοκινών, όπως είναι ο TNF- α και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), που προάγουν την ανάπτυξη της φλεγμονής, συμβάλλοντας έτσι στην παθολογία της NAFLD. Η εμπλοκή του μονοπατιού του NF- κ B στην προαγωγή της NAFLD και της NASH έχει περιγραφεί από αρκετές μελέτες και η ενεργοποίησή του μέσω του miR21 αποτελεί έναν από τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς της ανάπτυξης της νόσου⁽¹⁰⁹⁾⁻⁽¹¹²⁾.

Επιπλέον το miRNA-21 έχει αναδειχθεί ότι μπορεί να επάγει και την συσσώρευση λίπους, μέσω στόχευσης και σίγασης γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και την σύνθεση των λιπιδίων και να οδηγήσει έτσι σε στεάτωση. Πιο συγκεκριμένα, ένας χαρακτηριστικός στόχος του miRNA21 αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR α , που ο ρόλος του είναι να επάγει την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την λιπιδική β -οξείδωση. Αυτό φάνηκε από το γεγονός ότι τόσο σε μοντέλο ποντικού, όσο και ασθενών με NASH υπάρχει μία αντίστροφη συσχέτιση των επιπέδων του miR21 και του PPAR α ^{(113),(114)}. Επιπλέον, σε μοντέλο ποντικού με διαγραφή του γονιδίου του miR21 φάνηκε μία αύξηση της έκφρασης στους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO, που με την σειρά τους επηρεάζουν την λιπογένεση και την γλυκονεογένεση στα ηπατοκύτταρα⁽¹³¹⁾.



Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης του miRNA-21 στην δημιουργία στεάτωσης

Επιπροσθέτως, μία μελέτη κατέδειξε έναν καινούργιο στόχο του mir21 in vivo και in vitro την ρεδουκτάση HMGCR. Βρέθηκε μία αντίστροφη συσχέτιση των επιπέδων του miRNA21 και της HMGCR, καθώς αποδείχθηκε και ως στόχος του in vitro. Αυτό είναι σε συμφωνία με μελέτες που δείχνουν ανεβασμένα επίπεδα έκφρασης της HMGCR σε ασθενείς με NAFLD⁽¹¹⁶⁾. Η HMGCR αποτελεί ένζυμο απαραίτητο για την βιοσύνθεση της χοληστερόλης και καθώς τα επίπεδα του mir21, σύμφωνα με κάποιες μελέτες είναι μειωμένα σε ασθενείς με NAFLD η έκφραση και η δράση της αυξάνεται, προάγοντας την παραγωγή χοληστερόλης⁽¹¹⁵⁾.

Τέλος, μία ακόμα έρευνα συσχέτισε τα επίπεδα του miR-21 με τα επίπεδα της FABP7, μίας πρωτεΐνης που σχετίζεται με την πρόσληψη λιπαρών οξέων από τα κύτταρα. Τα μειωμένα επίπεδα του mir-21 κατά την NAFLD, που προτείνεται από κάποιες μελέτες, σχετίζονται με την αύξηση της έκφρασης της fatty acid binding protein 7 και άρα της αύξησης της πρόσληψης λιπαρών οξέων⁽¹¹⁷⁾.

Τα επίπεδα του miRNA-21 στο αίμα ασθενών με NAFLD και NASH έχουν φανεί ότι είναι διαταραγμένα σε μελέτες, αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα σύμφωνα μεταξύ των μελετών. Πιο συγκεκριμένα, στις περισσότερες μελέτες παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του miRNA-21 σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο (NASH), αλλά τα αποτελέσματα για την απλή στεάτωση (NAFLD) είναι διφορούμενα, με κάποιες μελέτες να μην δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό⁽¹¹⁸⁾, άλλες να δείχνουν μείωση των επιπέδων⁽¹¹⁶⁾ και άλλες αύξηση^{(119),(120)}. Αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται σε ετερογένεια στο μέγεθος του δείγματος, της μεθόδου διάγνωσης της νόσου και στην ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών που παίρνουν μέρος στην μελέτη. Τα παραπάνω ενισχύουν την υπόθεση ότι το miRNA-21 συμβάλει κυρίως στην πρόοδο της νόσου μέσω μονοπατιών φλεγμονής και στεάτωσης και τα επίπεδά του στο αίμα ίσως να μπορέσουν να αποτελέσουν έναν υποψήφιο κλινικό δείκτη για τον έλεγχο της προόδου της νόσου και ίσως τον διαχωρισμό της NASH από την NAFLD, χωρίς την ανάγκη επιβεβαίωσης με βιοψία ήπατος.

1.4 Διάγνωση και αντιμετώπιση της NAFLD και της NASH

1.4.1 Μέθοδοι διάγνωσης της NASH και της NAFLD

Η διάγνωση της NAFLD πραγματοποιείται μέσω απεικονιστικών τεχνικών και μέσω βιοψίας ήπατος, με δεδομένο την κατανάλωση κάτω από 30 γραμμάρια για τους άνδρες και 20 g αιθανόλης για τις γυναίκες⁽⁷⁵⁾. Η πιο ακριβής μέθοδος για την διάγνωση της NAFLD αποτελεί η

βιοψία ήπατος, καθώς επιτρέπει την εξακρίβωση του βαθμού φλεγμονής και ίνωσης των ασθενών άρα και το διαχωρισμό της NASH από την NAFLD. Επιπλέον, επιτρέπει τον διαχωρισμό της νόσου από άλλα αίτια στεάτωσης που έχουν διαφορετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά. Ιστολογικά η NAFLD αναγνωρίζεται από την συσσώρευση λίπους σε μεγάλες φυσαλίδες στο ήπαρ και η NASH από την επιπλέον παρουσία λοβικής φλεγμονής^{(73),(74)}. Το σκορ δραστηριότητας της NAFLD (NAS) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό της NASH από την στεάτωση στις κλινικές μελέτες. Το συγκεκριμένο σύστημα βαθμονόμησης υπολογίζει την συνολική βαθμολογία για τρεις μεταβλητές: την φλεγμονή, την στεάτωση και το “φούσκωμα” των ηπατοκυττάρων, και αν η συνολική τιμή είναι μεγαλύτερη του 5 τίθεται διάγνωση της NASH. Η παρουσία ίνωσης υπολογίζεται ξεχωριστά⁽⁷⁵⁾.

Καθώς η ηπατική βιοψία αποτελεί μία επεμβατική μέθοδο διάγνωσης και δεν είναι πάντοτε εύκολο να πραγματοποιηθεί, έχουν αναπτυχθεί και μη παρεμβατικοί απεικονιστικοί μέθοδοι ανίχνευσης της NAFLD. Το βασικό τους μειονέκτημα αποτελεί ότι δεν μπορούν να διαχωρίσουν την NASH, καθώς και τον βαθμό της ίνωσης⁽⁷⁶⁾. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη απεικονιστική τεχνική αποτελεί η υπερηχογραφία (ultrasonography). Στην συγκεκριμένη μέθοδο η ηπατική στεάτωση εντοπίζεται μέσω της φωτεινότερης εικόνας που παράγει το ηπατικό παρέγχυμα λόγω της συσσώρευσης του λίπους. Η αξονική τομογραφία, (computed tomography, CT) αποτελεί μία μέθοδο διάγνωσης της NAFLD που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης λίπους, μέσω της χρήσης των βαθμών Hounsfield. Η μαγνητική τομογραφία αποτελεί μία πιο ευαίσθητη απεικονιστική μέθοδο για την διάγνωση της στεάτωσης σε σχέση με την CT και την US σε επίπεδο 3%. Επιπρόσθετα, η ελαστογραφία αποτελεί μία μη επεμβατική τεχνική που υπολογίζει τον βαθμό της ίνωσης, η οποία βασίζεται σε τεχνολογία υπέρηχων και υπολογίζει την ηπατική ακαμψία.

Τέλος, ενδείξεις για την ύπαρξη της NAFLD μπορούν να ληφθούν μέσω βιοχημικών δεικτών, όπως είναι η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT) και η απαρτική αμινοτρανσφεράση (AST)⁽⁷⁷⁾. Επιπλέον, με βάση αυτούς τους δείκτες έχουν κατασκευαστεί συστήματα βαθμονόμησης όπως είναι το FIB-4 που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ίνωσης. Τα συστατικά αυτού του συστήματος βαθμονόμησης αποτελούν η ηλικία του εξεταζόμενου, η ALT, η AST και ο αριθμός των αιμοπεταλίων⁽⁷⁸⁾.

1.4.2 Διαχείριση και Αντιμετώπιση της NAFLD και της NASH

Οι επιστημονικοί οργανισμοί έχουν ανακοινώσει οδηγίες για την διαχείριση της νόσου καθώς δεν υπάρχει μέχρι σήμερα συγκεκριμένη θεραπεία για την NAFLD και την NASH. Οι οργανισμοί

αυτοί είναι ο Ευρωπαϊκός Σύλλογος για την μελέτη του ήπατος (EASL), το Ινστιτούτο Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου, ο Ιταλικός Σύλλογος της μελέτης του ήπατος (AISF), ο Αμερικάνικος Σύλλογος (AASLD) και τέλος ο οργανισμός της Ασίας και της Ωκεανίας. Πιο συγκεκριμένα, η εστίαση γίνεται στην διατροφή και στον τρόπο ζωής των ασθενών. Ο Ευρωπαϊκός Σύλλογος για την μελέτη του ήπατος (EASL) και ο Ιταλικός (AISF) προτείνουν την μεσογειακή διατροφή ως την καταλληλότερη διατροφή και την αντιμετώπιση της NAFLD. Επιπλέον, όλοι οι οργανισμοί συμφωνούν σε μία μείωση της ενεργειακής κατανάλωσης από τους ασθενείς, με στόχο την απώλεια βάρους, καθώς και αύξηση της φυσικής δραστηριότητας μέσω είτε αερόβιας άσκησης, είτε άσκησης με αντιστάσεις.

Μέχρι σήμερα, κανένα φάρμακο δεν έχει εγκριθεί αποκλειστικά για την NAFLD και την NASH και οι παραπάνω οργανισμοί συμφωνούν ότι οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή πρέπει να δίνεται σε ασθενείς με προχωρημένη NASH και μετά από αξιολόγηση της κατάστασης του ασθενούς και των κινδύνων. Τέλος, σε ασθενείς που δεν μπορούν να κάνουν τις απαραίτητες αλλαγές στον τρόπο ζωής, με σκοπό την μείωση του βάρους και την διαχείριση των μεταβολικών επιπλοκών και δεν ανταποκρίνονται στην φαρμακευτική αγωγή, οι οργανισμοί της Ευρώπης και της Αμερικής προτείνουν το βαριατρικό χειρουργείο καθώς πέρα από την απώλεια βάρους και την βελτίωση των μεταβολικών επιπλοκών, το χειρουργείο μειώνει την στεάτωση και την ίνωση στο ήπαρ⁽⁷⁹⁾.

2.Σκοπός

Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η εξέταση των διαφορών στα επίπεδα του miRNA-21 μεταξύ τριών ομάδων ατόμων. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από εθελοντές που είχαν διαγνωστεί με NAFLD, η δεύτερη ομάδα αποτελείται από εθελοντές που είχαν διαγνωστεί με NASH και η τρίτη ομάδα εθελοντών αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, στην οποία οι εθελοντές ήταν υγιείς. Δευτερεύοντα στόχο της διατριβής αποτέλεσε η εξέταση της σχέσης των επιπέδων του microRNA-21 με ανθρωπομετρικές και βιοχημικές μετρήσεις, με σκοπό την ερμηνεία της δράσης τους στην παθοφυσιολογία της νόσου.

3. Μεθοδολογία

3.1 Σχεδιασμός Μελέτης και Περιγραφή δείγματος

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά δεδομένα εθελοντών από δύο μελέτες, την μελέτη MAST4HEALTH, μία πολυκεντρική διπλά τυφλή μελέτη, που αξιολόγησε την φαρμακολογική χρήση της μαστίχας σε άτομα με NASH και την μελέτη “Παχυσαρκία και μεταβολικό σύνδρομο: διατροφική παρέμβαση με Κορινθιακή σταφίδα σε λιπώδη διήθηση του ήπατος (NAFLD/NASH) –Διερεύνηση μοριακών μηχανισμών δράσης”, μία συγχρονική επιδημιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο σε συνεργασία με το Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκε πλάσμα αίματος από εθελοντές για την μέτρηση των επιπέδων του hsa-miR-21-5p με τη χρήση της τεχνικής αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Τα ερευνητικά πρωτόκολλα των παραπάνω μελετών έχουν λάβει έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου.

Ο συνολικός πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν 64 άτομα, από τους οποίους οι 26 ήταν εθελοντές της μελέτης MAST4HEALTH και οι 38 αποτέλεσαν εθελοντές από την μελέτη NAFLD.

Η διάγνωση έγινε με την χρήση υπερηχογραφήματος άνω κοιλίας για τους εθελοντές της μελέτης NAFLD και με μαγνητική τομογραφία ήπατος με τη χρήση του πρωτοκόλλου LiverMultiScan για τους εθελοντές της μελέτης MAST4HEALTH.

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

3.2 Δεδομένα του δείγματος

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών δηλαδή το Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI), το φύλο, η ηλικία και ο λόγος της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια του ισχίου (WHR) για την εύρεση συσχετίσεων με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p. Για τον ίδιο λόγο, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα βιοχημικών παραμέτρων του δείγματος. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν δεδομένα για τα επίπεδα της γλυκόζης, της ινσουλίνης, της λεπτίνης, του σιδήρου, της φερριτίνης και της αλβουμίνης. Λήφθηκαν επίσης, δεδομένα για τα επίπεδα των λιπιδίων των εθελοντών και συγκεκριμένα η ολική χοληστερόλη, τα ολικά τριγλυκερίδια, η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη και η

πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη. Επιπρόσθετα, λήφθηκαν δεδομένα για δείκτες αξιολόγησης της ηπατικής λειτουργίας και συγκεκριμένα τα επίπεδα της οξαλοξικής τρανσαμινάσης, της πυροσταφυλικής τρανσαμινάσης και της γ-γλουταμυλ-τρανσφεράσης.

Επιπλέον, συστήματα βαθμονόμησης της ίνωσης και της αντίστασης στην ινσουλίνη αξιολογήθηκαν ως προς την σχέση τους με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p. Τα συστήματα βαθμονόμησης της ίνωσης που αξιολογήθηκαν ήταν τα FIB-4 και το NFS.

Το FIB-4 υπολογίζεται από την εξίσωση: ηλικία(έτη)*ασπαρτική αμινοτρανσφεράση(U/L)/αριθμός αιμοπεταλίων*(10⁹/L)*αμινοτρανσφεράση της αλανίνης. Το NFS υπολογίζεται από την εξίσωση: -1,675 + 0,037*ηλικία(έτη) + 0,094*BMI(kg/m²) + IFG/διαβήτη(ναι=1, όχι=2) + 0,99*AST/ALT – 0,013*αριθμό αιμοπεταλίων(10⁹/L) – 0,66*αλβουμίνη (g/dL) Τέλος για την αξιολόγηση της αντίστασης στην ινσουλίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HOMA-IR, που υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης: ινσουλίνη νηστείας (microU/L) * γλυκόζη νηστείας (nmol/L)/22.5.

3.3 Πρωτόκολλο Απομόνωσης ολικού RNA από το πλάσμα των εθελοντών

Για την απομόνωση του RNA από το πλάσμα των εθελοντών, που ήταν αποθηκευμένο στους -80 °C για αποφυγή αλλοιώσεων, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο απομόνωσης ολικού RNA MagMAX™ *mirVna*™ της εταιρίας Thermo Fisher SCIENTIFIC. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην χρήση μαγνητικών σφαιριδίων, που δεσμεύουν το ολικό RNA και στην συνέχεια με την χρήση του Magnetic Stand-96 και διαδοχικών εκλούσεων με τα κατάλληλα αντιδραστήρια το RNA μπορεί να απομονωθεί ως υπερκείμενο.

Αναλυτικότερα, τα δείγματα πέπτονται αρχικά με την ειδική πρωτεΐνωση για την καταστροφή των πρωτεϊνών και στην συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με χρήση της 2-μερκαπτοαιθανόλης, με επιπλέον προσθήκη του εξωγενούς microRNA Cel-miR-39-3p, που θα χρησιμοποιηθεί για την καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων της RT-PCR. Ακολουθείται δέσμευση του RNA με τη χρήση του ειδικού διαλύματος που περιέχει τα μαγνητικά σφαιρίδια. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του υπερκείμενου από τα σφαιρίδια με την χρήση του Magnetic Stand-96, που δεσμεύει τα σφαιρίδια με το RNA στα τοιχώματα, επιτρέποντας την απόρριψη του υπερκείμενου χωρίς την απώλεια RNA. Ακολουθεί επανάληψη της διαδικασίας με την χρήση διαλυμάτων καθαρισμού και ολιγόλεπτες φυγοκεντρήσεις και τελικά την προσθήκη ειδικής DNAάσης στα δείγματα για την καταστροφή του DNA. Τελικά, χρησιμοποιείται ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την επαναδέσμευση του RNA στα σφαιρίδια και

χρήση διαλυμάτων καθαρισμού και μετέπειτα επώαση, με το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης στους 65 °C. Τελευταίο βήμα της μεθόδου, αποτελεί η τοποθέτηση του δείγματος με το διάλυμα έκλουσης που, το RNA από τις σφαίρες στο Magnetic Stand-96 και πρόσληψης και αποθήκευσης του στους -20 °C του υπερκείμενου, που περιέχει το ολικό RNA για μετέπειτα χρήση.

3.4 Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA

Η μετατροπή του ολικού RNA σε συμπληρωματικό DNA με τη χρήση της μεθόδου ανάστροφης PCR, αποτελεί ενδιάμεσο βήμα, πριν την πραγματοποίηση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου για την μελέτη των επιπέδων του microRNA. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με την χρήση του πακέτου TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit.

Το πρώτο στάδιο της μεθόδου, αποτελεί η αντίδραση της πολύ-αδενυλίωσης στο RNA. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται μέσω της προσθήκης του ενζύμου πολύ-αδενυλίωσης μαζί με ATP, ρυθμιστικό διάλυμα και νερό. Η διαδικασία πραγματοποιείται για 45 λεπτά στους 37 °C και επιπρόσθετα 10 λεπτά στους 65 °C για την παύση της.

Το επόμενο στάδιο αποτελεί η αντίδραση του προσαρμογέα σύνδεσης. Στην συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται το ένζυμο RNA λιγάση, ο προσαρμογέας, καθώς και ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, νερό και το PEG 8000. Η διαδικασία πραγματοποιείται στους 16 °C για 60 λεπτά.

Το τρίτο στάδιο αποτελεί η αντίδραση της "ανάστροφης" PCR για την δημιουργία του συμπληρωματικού DNA. Τα αντιδραστήρια αυτού του σταδίου αποτελούν το ειδικό ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα για την RT, ένας μη ειδικός εκκινητής, μείγμα dNTP και νερό. Η αντίδραση διαρκεί 15 λεπτά στους 42 °C και επιπρόσθετα 5 λεπτά για την παύση της στους 85 °C.

Τελευταίο στάδιο της μεθόδου, αποτελεί η ενίσχυση των microRNAs. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιείται ειδικό μείγμα εκκινητών για στοχευμένη ενίσχυση των microRNAs, καθώς και ειδικό μείγμα αντιδραστηρίων και νερό. Η αντίδραση ξεκινά στους 95 °C για 5 λεπτά για την ενεργοποίηση του ενζύμου και ακολουθείται από 14 κύκλους διάστασης των αλυσίδων του cDNA και επιμήκυνση των μεταγράφων. Για να σταματήσει η αντίδραση το μείγμα παραμένει στους 99 °C για 10 λεπτά.

3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου RT-PCR

Η μέτρηση των επιπέδων του hsa-miR-21-5p πραγματοποιήθηκε με την χρήση της μεθόδου RT-PCR. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την εύρεση της σχετικής διαφοράς των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης τους. Η έκφρασή τους ορίζεται ως κατωφλιού ανίχνευσης (CT), δηλαδή τους κύκλους της αντίδρασης της πολυμεράσης που απαιτούνται ώσπου το σήμα του φθορισμού, που παράγεται λόγω του πολλαπλασιασμού του cDNA, να ξεπεράσει το σήμα φθορισμού του υποβάθρου. Η τιμή του CT είναι αντιστρόφως ανάλογη με τα επίπεδα του miRNA, καθώς όσο μεγαλύτερη ποσότητα miRNA υπάρχει αρχικά στο δείγμα τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να παρατηρηθεί το σήμα του φθορισμού που οφείλεται στον πολλαπλασιασμό του μέσω της RT-PCR.

Για την υλοποίηση της RT-PCR απαιτείται η κατασκευή ενός μείγματος που περιέχει 10 μ L TaqMan® Fast Advanced Master Mix, 1 μ L TaqMan® Advanced miRNA Assay και 4 Ml νερού. Στο μίγμα περιέχονται ειδικοί εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του κάθε υπό μελέτη miRNA. 15 μ L μίγματος τοποθετούνται μαζί με 5 μ L προϊόντος της ανάστροφης PCR, που έχει προηγουμένως αραιωθεί με νερό. Το σύνολο των 20 μ L μεταφέρεται σε ειδικά πηγάδια σε μία πλαστική πλάκα που στην συνέχεια τοποθετείται στο μηχάνημα της RT-PCR για ανάλυση. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι το StepOnePlus™ System της εταιρίας Thermo Fisher Scientific.

Η αντίδραση έχει 2 στάδια, που το πρώτο αποτελεί την ενεργοποίηση του ενζύμου στους 95 °C για 20 δευτερόλεπτα και ακολουθείται από 40 επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης των αλυσίδων και επιμήκυνσης των αλυσίδων, που λαμβάνουν χώρα στους 95 °C για 1 δευτερόλεπτο και στους 60 °C για 20 δευτερόλεπτα αντίστοιχα.

3.6 Εφαρμογή κανονικοποίησης με τον μέσο όρο έκφρασης επιλεγμένων microRNAs και κανονικοποίησης με την χρήση εξωγενούς microRNA για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Για την καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε “κανονικοποίηση” των αποτελεσμάτων για την έκφραση του hsa-miR-21-5p με δύο διαφορετικές μεθόδους την μέθοδο της κανονικοποίησης με τον μέσο όρο της έκφρασης διαφόρων microRNAs και της κανονικοποίησης με την χρήση εξωγενούς microRNA . Αυτές οι μέθοδοι επιβεβαιώνονται από την βιβλιογραφία ως οι ιδανικότερες μέθοδοι για την ανάλυση της έκφρασης των microRNAs μέσω της χρήσης της τεχνικής RT-PCR^{(121),(122)}. Στην πρώτη περίπτωση, τα επίπεδα έκφρασης του

microRNA συγκρίνονται με την μέση τιμή έκφρασης τουλάχιστον άλλων τριών microRNA. Στη παρούσα μελέτη τα microRNA αυτά ήταν τα: cel-miR-39-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-191-5p.

Στην περίπτωση της κανονικοποίησης με την χρήση εξωγενούς microRNA χρησιμοποιείται ένα εξωγενές microRNA, στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το cel-miR-39-3p, με την έκφραση του οποίου συγκρίνονται οι διαφορές στην έκφραση του microRNA που μελετάται, καθώς το εξωγενές microRNA εισάγεται σε συγκεκριμένη ποσότητα σε όλα τα δείγματα και η έκφραση του είναι σταθερή.

3.7 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών ελέγχθηκε μέσω του κριτηρίου Kolmogorov-Smirnov. Για την σύγκριση των μέσων όρων των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων (Control, NAFLD, NASH) πραγματοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα ONEWAY-ANOVA. Στην περίπτωση που οι ποσοτικές μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μέσω του κριτηρίου Kruskal-Wallis. Η συσχέτιση των μη κανονικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο κατά Spearman και για την εξέταση συσχετίσεων των κανονικών μεταβλητών με τον έλεγχο κατά Pearson. Για την εύρεση της συσχέτισης των βιοχημικών και ιστολογικών μεταβλητών (ανεξάρτητες μεταβλητές) με τα επίπεδα του microRNA, που αποτέλεσαν την εξαρτημένη μεταβλητή, εφαρμόστηκαν μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 21.0 της εταιρίας IBM.

4.Αποτελέσματα

4.1 Χαρακτηριστικά του δείγματος

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των εθελοντών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη, καθώς και οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων. Ο συνολικός πληθυσμός αποτελείται από 64 άτομα. Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από 21 άτομα, η ομάδα NAFLD από 17 και η ομάδα NASH από 26. Ο μέσος όρος για την ηλικία ήταν 47,2 έτη, με τυπική απόκλιση 10 ετών για την ομάδα ελέγχου, 52,1 έτη με τυπική απόκλιση 6,4 ετών για την ομάδα NAFLD και 52,2 έτη με τυπική απόκλιση 7,7 ετών για την ομάδα NASH. Δεν υπήρξε στατιστική σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία μεταξύ των τριών ομάδων.

Η ομάδα ελέγχου είχε μέσο όρο 25,6 (kg/m²) δείκτη μάζας σώματος με τυπική απόκλιση 3,4 μονάδες (kg/m²), η ομάδα NAFLD είχε μέσο όρο 29,9 με τυπική απόκλιση 2,9 (kg/m²) και η ομάδα NASH 37,3 (kg/m²), με τυπική απόκλιση 6,2 (kg/m²). Παρατηρήθηκε μία στατιστικώς σημαντική διαφορά στο BMI μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των ομάδων των NAFLD και NASH, καθώς και μεταξύ των ομάδων NAFLD και NASH (p-value<0,05).

Για τον λόγο της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια ισχίου η ομάδα ελέγχου είχε μέσο όρο 0,83 cm και τυπική απόκλιση 0,08cm, η ομάδα NAFLD είχε μέσο όρο 0,98 cm και τυπική απόκλιση 0,067 cm και η ομάδα NASH είχε μέσο όρο 1 cm και τυπική απόκλιση 0,068 cm. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, μεταξύ της ομάδας ελέγχου με τις ομάδες NAFLD και NASH, ενώ μεταξύ των ομάδων NAFLD και NASH δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά πληθυσμού και συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

	Control(N=21)	NAFLD(N=17)	NASH(N=26)	p ¹	p ²	p ³
AGE	47,2± 10	52,1±6,4	52,2±7,7	0,214	0,119	1
BMI	25,6±3.4	29,9±2,9	37,3±6,2	0,017	<0,001	<0,001
WHR	0,83±0,08	0,98± 0,067	1±0,068	<0,001	<0,001	1

p-value<0,05

p¹: p-value control-NAFLD

p²: p-value control-NASH

p³: p-value NAFLD-NASH

Στον Πίνακα 2 συγκρίνονται τα σκορ της νόσου (FIB-4 και NFS) για τις 3 ομάδες. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα δεν υπάρχουν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς την ίνωση.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα για τον βαθμό ίνωσης των εθελοντών με τη χρήση των σκορ FIB-4 και NFS και συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων.

	Control(N=21)	NAFLD(N=17)	NASH(N=26)	p ¹	p ²	p ³
FIB4	0,9±0,24	0,96±0,42	0,77±0,313	1	0,524	0,223
NFS	-2,55±0,71	-2,01±1,05	-1,89±1,2	0,31	0,092	1

p-value<0,05

p¹: p-value control-NAFLD

p²: p-value control-NASH

p³: p-value NAFLD-NASH

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για διάφορους δείκτες αξιολόγησης της μεταβολικής και βιοχημικής λειτουργίας των τριών ομάδων, καθώς και οι διαφορές μεταξύ αυτών.

Παρατηρήθηκαν, αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας (GLU) στην ομάδα NASH σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες, δηλαδή την ομάδα ελέγχου και την ομάδα NAFLD. Επιπλέον, τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης (TC), εμφανίστηκαν χαμηλότερα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα NAFLD. Τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (TG) της ομάδας ελέγχου εντοπίστηκαν χαμηλότερα σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες. Τα επίπεδα της αμινοτρανσφοράς της αλανίνης (SGPT) ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα NASH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αντίσταση στην ινσουλίνη, μέσω της μέτρησης της μεθόδου HOMA-IR, φάνηκε εντονότερη στην ομάδα NASH σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες, επίσης ο μέσος όρος των τιμών των επιπέδων της ινσουλίνης ήταν και αυτός υψηλότερος στην ομάδα NASH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος, τα επίπεδα της γ-γλουταμύλ-τρανσφοράς παρατηρήθηκαν αυξημένα στην ομάδα NASH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα δεικτών βιοχημικής και μεταβολικής λειτουργίας των εθελοντών και συγκρίσεις μεταξύ των τριών ομάδων.

	Control(N=21)	NAFLD(N=17)	NASH(N=26)	p ¹	p ²	p ³
FE	104,55±33,6	108,8±26,44	89,9±26,41	1	0,28	0,118
GLU	86,33±7,55	92,52±10,7	106,3±11,52	0,199	<0,001	<0,001
TC	185,86±40	217,4±31	192,6±31,9	0,021	1	0,075
LDL	113,9±35,1	135,9±27,45	115±29	0,096	1	0,101
ALV	4,48±0,2	4,6±0,27	4,56±0,25	0,325	0,358	1
FERR	99,07±71,8	144,01±108	126,5±114,1	0,523	1	1
HDL	54,55±17,55	49,25±12	47,9±9,8	0,685	0,287	1
TG	86,7±47,6	161,5±75,8	148,1±64	0,002	0,004	1
SGOT	20,3±4	23,58±9	22,11±6,3	0,397	1	1
SGPT	22,57±10,2	30,23±15,45	32,2±13	0,220	0,040	1
GGT	20,3±13,47	27,35±14	53,4±67,1	1	0,040	0,191
HOMA-IR	2,56±2,89	3,2±1,14 [†]	6,1±4,7	1	0,003	0,027
INS	11,83±13,19	13,84±4,28	23,41±18,31	1	0,021	0,101

p-value<0,05

p¹: p-value control-NAFLD

p²: p-value control-NASH

p³: p-value NAFLD-NASH

4.2 Αποτελέσματα των μετρήσεων του hsa-miR-21-5p

Στον Πίνακα 4 φαίνονται τα αποτελέσματα των επιπέδων του hsa-miR-21-5p μεταξύ των ομάδων πριν, εκφρασμένα ως κατώφλι ανίχνευσης (CT) και μετά την κανονικοποίηση με χρήση του μέσου όρου έκφρασης των επιλεγμένων microRNAs και την κανονικοποίηση με τη χρήση της έκφρασης του εξωγενούς microRNA (cel-miR-39-3p). Παρατηρήθηκε μία στατικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του hsa-miR-21-5p, μετά την κανονικοποίηση με τη χρήση του εξωγενούς microRNA στην ομάδα NASH σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες.

Πίνακας 4: Σύγκριση των επιπέδων του *hsa-miR-21-5p* μεταξύ των τριών ομάδων.

	Control(N=21)	NAFLD(N=17)	NASH(N=26)	p ¹	p ²	p ³
Κατώφλι ανίχνευσης (CT)	26,07±2,7	24,37±3,48	23,74±4,6	0,530	0,118	1
Κανονικοποίηση με τον μέσο όρο έκφρασης των microRNAs	1,57±1,58	1,1±0,59	0,88±0,58	0,502	0,076	1
Κανονικοποίηση με την χρήση της έκφρασης του cel- miR-39-3p	0,48±0,7	0,27±0,22	2,1±2,42	1	0,003	0,002

p-value < 0,05

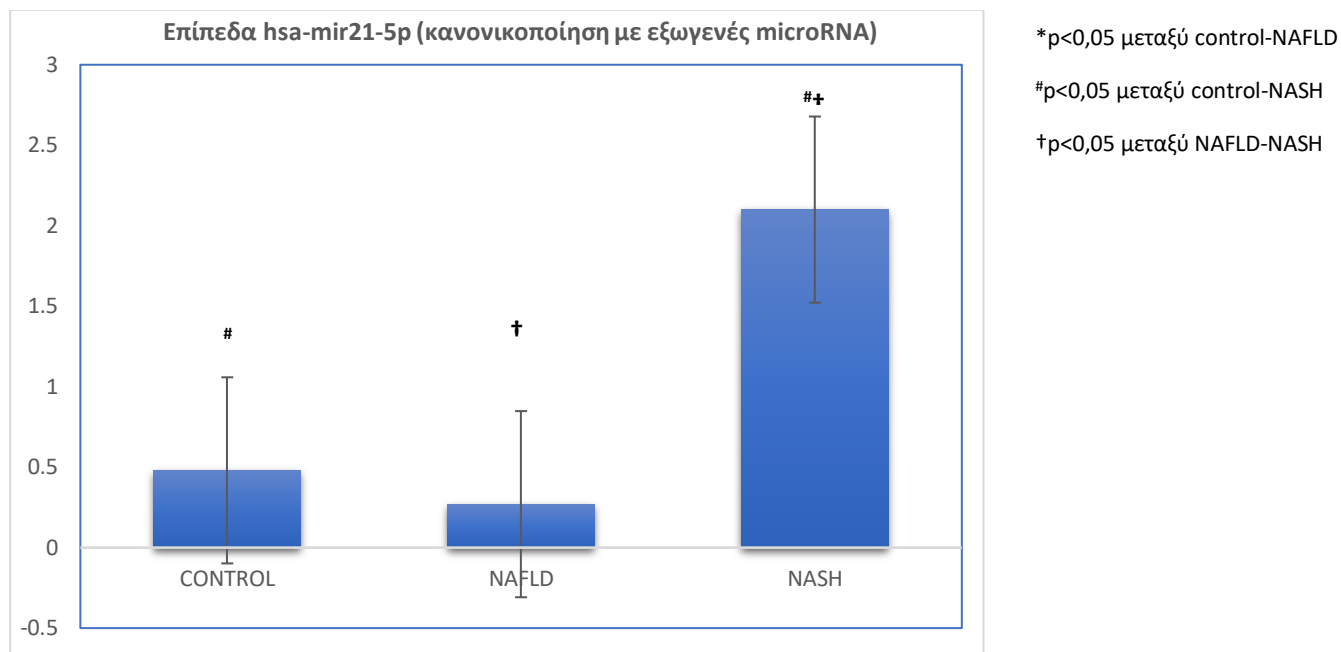
p¹: p-value control-NAFLD

p²: p-value control-NASH

p³: p-value NAFLD-NASH

Στο Γράφημα 1 παρουσιάζονται οι διαφορές των επιπέδων του *hsa-miR-21-5p* μεταξύ των ομάδων μετά την κανονικοποίηση με το εξωγενές microRNA (cel-miR-39-3p).

Γράφημα 1: Διαφορές στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p μετά την κανονικοποίηση με το εξωγενές microRNA μεταξύ των ομάδων.



4.3 Επίδραση Ανθρωπομετρικών και Βιοχημικών μεταβλητών στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p

Στον Πίνακα 5, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων κατά Spearman (R) μεταξύ των επιπέδων του hsa-miR-21-5p με την ηλικία, τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, τους βιοχημικούς δείκτες, καθώς και με τους δείκτες του βαθμού της ίνωσης.

Για τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p βάση του κατωφλιού ανίχνευσης (CT), παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις με την SGOT, την ινσουλίνη και το HOMA-IR. Τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, μετά την εφαρμογή της κανονικοποίησης με το μέσο όρο των επιλεγμένων microRNAs, συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά μόνο με τα επίπεδα της SGOT.

Τέλος, τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p μετά την κανονικοποίηση με τη χρήση εξωγενούς microRNA (cel-miR-39-3p) συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα της γλυκόζης, της ινσουλίνης και του HOMA-IR και αρνητικά με το FIB-4.

Πίνακας 5: Συσχετίσεις μεταξύ των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών, των βιοχημικών δεικτών και του βαθμού της ίνωσης των εθελοντών με τα επίπεδα του *hsa-miR-21-5p*.

	Κατώφλι ανίχνευσης (CT)		Κανονικοποίηση με το μέσο όρο έκφρασης των miRs		Κανονικοποίηση με την χρήση του cel-miR-39-3p	
	Συντελεστής συσχέτισης(R)	p-value	R	p-value	Συντελεστής συσχέτισης(R)	p-value
Age	0,111	0,383	-0,181	0,151	-0,171	0,180
BMI	-0,122	0,337	-0,106	0,407	0,237	0,061
WHR	-0,177	0,163	-0,145	0,254	0,137	0,283
FE	0,068	0,594	0,117	0,361	-0,247	0,053
FERRITIN	-0,159	0,212	0,134	0,296	0,163	0,205
GLU	-0,140	0,270	-0,111	0,385	0,261	0,039
TC	-0,005	0,969	-0,139	0,273	-0,046	0,719
HDL	0,090	0,481	-0,161	0,203	-0,187	0,141
LDL	-0,019	0,882	-0,157	0,214	-0,008	0,948
TG	-0,238	0,059	0,014	0,910	0,227	0,073
SGOT	-0,263	0,036	0,265	0,034	0,187	0,143
SGPT	-0,209	0,098	0,119	0,351	0,189	0,137
GGT	-0,160	0,205	-0,10	0,938	0,205	0,107
ALV	-0,116	0,360	0,132	0,300	0,194	0,128
INS	-0,394	0,001	0,048	0,704	0,382	0,002
HOMA-IR	-0,347	0,005	0,018	0,886	0,381	0,002
LEPTIN	0,216	0,228	-0,187	0,299	0,027	0,883

NFS	0,019	0,882	-0,091	0,476	-0,237	0,061
FIB-4	0,057	0,657	0,065	0,610	-0,282	0,025
LIF	0,268	0,186	-0,136	0,507	-0,177	0,396
FAT	0,100	0,626	-0,029	0,889	-0,037	0,861
CT1	0,274	0,176	-0,139	0,498	-0,177	0,398

p-value<0,05

Στον Πίνακα 6, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για τον προσδιορισμό της συσχέτισης των βιοχημικών παραμέτρων (Glu, Ins, Homa-IR, FIB-4) με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p μετά από την κανονικοποίηση με την χρήση εξωγενούς microRNA (cel-miR -39-3p) (Μοντέλο 1).

Πραγματοποιήθηκε διόρθωση για το φύλο, την ηλικία και το BMI, για την συσχέτιση των βιοχημικών παραμέτρων με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p έπειτα της κανονικοποίησης με την χρήση εξωγενούς microRNA (cel-miR-39-3p) (Μοντέλο 2).

Στο μοντέλο 3, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση με διόρθωση του φύλου, της ηλικίας, του BMI και της λήψης φαρμακευτικής αγωγής για τον προσδιορισμό της επίδρασης των βιοχημικών παραμέτρων στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, μετά από την κανονικοποίηση με την χρήση εξωγενούς microRNA (cel-miR-39-3p).

Καμία από τις παραμέτρους δεν διατήρησε την επίδρασή της στα επίπεδα του has-miR-21-5p μετά της εφαρμογής προσαρμογών δηλαδή στα μοντέλα 2 και 3 ($p>0,05$).

Πίνακας 6: Συσχέτιση των επιπέδων γλυκόζης, ινσουλίνης, της αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR), και της ινώσης (FIB-4) με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, μετά από κανονικοποίηση με εξωγενές microRNA (cel-miR-39-3p) με την χρήση γραμμικής παλινδρόμησης.

Κανονικοποίηση με χρήση εξωγενούς microRNA (cel-miR- 39-3p)	Μοντέλο 1			Μοντέλο 2 (διόρθωση για ηλικία, φύλο και BMI)			Μοντέλο 3 (διόρθωση για ηλικία, φύλο, BMI, φάρμακα για διαβήτη τύπου 2)		
	BHTA	95% CI	p- value	BETA	95% CI	p- value	BHTA	95% CI	p-value

glucose	0,026	0,09-0,043	0,124	0,019	0-0,038	0,342	0,030	0,010-0,040	0,135
Insulin	0,019	0,004- 0,034	0,204	0,013	-0,002-0,028	0,373	0,008	-0,007-0,023	0,605
HOMA-IR	0,089	0,03-0,148	0,135	0,062	0,002-0,122	0,311	0,042	-0,02-0,104	0,5
FIB-4	- 1,648	-2,31-(- 0,9)	0,015	-0,407	-1,214-0,4	0,616	-0,48	-1,281-0,319	0,550

p-value<0,05

Στον Πίνακα 7, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για την επίδραση βιοχημικών παραμέτρων (SGOT,Ins,HOMA-IR) στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, όπως εκφράζονται με το CT (Μοντέλο 1).

Στο Μοντέλο 2, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση με διόρθωση της επιρροής του φύλου, της ηλικίας και του BMI για την επίδραση των βιοχημικών παραμέτρων στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p (CT).

Στο Μοντέλο 3, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση με διόρθωση για την επιρροή του φύλου, της ηλικίας, του BMI και της λήψης φαρμακευτικής αγωγής, με σκοπό τον προσδιορισμό του προσδιορισμού της επίδρασης των βιοχημικών παραμέτρων στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p (CT). .

Τα επίπεδα της ινσουλίνης διατήρησαν την συσχέτιση τους με τα επίπεδα του hsa-miR-21 στο μοντέλο 2 ($p<0,05$), αλλά αυτή η επίδραση εξαλείφθηκε όταν πραγματοποιήθηκε διόρθωση και για την λήψη φαρμάκων για τον διαβήτη τύπου 2.

Τα επίπεδα της SGOT δεν διατήρησαν την συσχέτιση τους του σε κανέναν από τα τρία μοντέλα ($p>0,05$).

Το HOMO-IR φάνηκε να συσχετίζεται με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p και στα τρία μοντέλα ($p<0,05$).

Πίνακας 7: Προσδιορισμός της συσχέτισης της οξαλοξική τρανσαμινάσης (SGOT), της ινσουλίνης και της αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR) με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p (CT), με την χρήση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης.

CT	Μοντέλο 1			Μοντέλο 2 (διόρθωση για ηλικία, φύλο και BMI)			Μοντέλο 3 (διόρθωση για ηλικία, φύλο, BMI, φάρμακα για διαβήτη τύπου 2)		
	ΒΗΤΑ	95% CI	p-value	ΒΗΤΑ	95% CI	p-value	ΒΗΤΑ	95% CI	p-value
SGOT	-0,136	-0,209-(-0,063)	0,066	-0,139	-0,216-(-0,062)	0,078	-0,143	-0,219-(-0,067)	0,064
INS	-0,072	-0,104-(-0,04)	0,027	-0,079	-0,114-(-0,044)	0,027	-0,067	-0,103-(-0,031)	0,065
HOMA-IR	-0,3	-0,423-(-0,177)	0,018	-0,344	-0,483-(-0,205)	0,016	-0,303	-0,445-(-0,161)	0,038

p-value<0,05

Στον πίνακα 8, πραγματοποιήθηκε γραμμική παλινδρόμηση με για τον προσδιορισμό της συσχέτισης των βιοχημικών παραμέτρων (SGOT) με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, μετά την κανονικοποίηση με την χρήση του μέσου όρου έκφρασης των επιλεγμένων microRNAs.

Η SGOT δεν φάνηκε να επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p σε κανένα από τα τρία μοντέλα.

Πίνακας 8: Συσχέτιση των επιπέδων της οξαλοξικής αμινοτρανσεράσης στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p έπειτα από κανονικοποίηση με τον μέσο όρο έκφρασης των τριών επιλεγμένων microRNA, με την χρήση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης.

Κανονικοποίηση με την χρήση του μέσου όρου έκφρασης των επιλεγμένων microRNAs	Μοντέλο 1			Μοντέλο 2 (διόρθωση για ηλικία, φύλο και BMI)			Μοντέλο 3 (διόρθωση για ηλικία, φύλο, BMI, φάρμακα για διαβήτη τύπου 2)		
	BHTA	95% CI	P	BHTA	95% CI	p	BHTA	95% CI	P
SGOT	0,013	-0,07-0,023	0,062	0,023	0,002-0,044	0,277	0,023	0,002-0,044	0,266

p-value<0,05

5. Συζήτηση

5.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων

Πρωτεύων στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση διαφορών στα επίπεδα του hsa-miR-21-5p μεταξύ τριών ομάδων εθελοντών, την ομάδα ελέγχου, την ομάδα NAFLD και την ομάδα NASH. Παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του miRNA-21 στην ομάδα NASH σε σχέση με τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου ($p=0,003$) και της ομάδας NAFLD ($p=0,002$). Αυτό το εύρημα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που καταδεικνύουν την αύξηση της παραγωγής του σε ηπατοκύτταρα και κυκλοφορία σε ασθενείς με NASH καθώς και με την πρόοδο της NAFLD^{(122),(123)} και αποτελέσματα μελετών σε πειραματόζωα⁽¹¹⁶⁾. Τα επίπεδα του has-miR-21-5p δεν βρέθηκαν να έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας της NAFLD και της ομάδας ελέγχου, αποτέλεσμα που είναι σε συμφωνία με μία μελέτη, όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα του microRNA 21 στο αίμα 34 ασθενών με NAFLD⁽¹¹⁸⁾. Όμως, το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι σε συμφωνία με όλες τις μελέτες, καθώς σε μία μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του miRNA 21 στο αίμα 48 ανδρών με NAFLD⁽¹¹⁹⁾ και σε μία άλλη μελέτη τα επίπεδα φάνηκαν μειωμένα στο αίμα 25 εθελοντών με NAFLD σε σχέση με 18 υγιείς⁽¹¹⁶⁾. Η συσχέτιση υπήρξε στατιστικώς σημαντική μόνο μετά την κανονικοποίηση με χρήση εξωγενούς microRNA (cel-miR-39-3p), που αποτελεί μία βιβλιογραφικά τεκμηριωμένη μέθοδο ανάλυσης της έκφρασης των microRNA με χρήση RT-PCR⁽¹²¹⁾.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος συσχετίσεων μεταξύ διάφορων ιστολογικών, ανθρωπομετρικών και βιοχημικών μεταβλητών του πληθυσμού με τα επίπεδα του has-miR-21 με τη χρήση της μεθόδου Spearman. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων SGOT, των επιπέδων της ινσουλίνης και της δοκιμής για υπολογισμό της αντίστασης στην ινσουλίνη HOMA-IR ($p<0,05$) με το CT των microRNA. Όπως αναφέρθηκε στην Μεθοδολογία, το CT σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα των microRNA και άρα οι παραπάνω δείκτες σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p στο πλάσμα των εθελοντών. Όμοια διαδικασία, πραγματοποιήθηκε για την εξακρίβωση συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών και με τα επίπεδα των microRNA, μετά την κανονικοποίηση με την χρήση του μέσου όρου της έκφρασης των επιλεγμένων microRNAs και την κανονικοποίηση με την χρήση της έκφρασης του εξωγενούς microRNA (cel-miR-39-3p). Τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, μετά την κανονικοποίηση με την χρήση του μέσου όρου της έκφρασης των επιλεγμένων microRNAs, συσχετίστηκαν μόνο με τα επίπεδα της SGOT ($p<0,05$). Τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p, μετά την κανονικοποίηση με

την χρήση της έκφρασης του εξωγενούς microRNA (cel-miR-39-3p), συσχετίστηκαν με τα επίπεδα της ινσουλίνης, της γλυκόζης, με τις τιμές του HOMA-IR και με τα επίπεδα της ίνωσης, σύμφωνα με το σύστημα υπολογισμού της, FIB-4 ($p < 0,05$). Τα επίπεδα του microRNA-21 έχουν επίσης συσχετιστεί, σε μία μελέτη με βιοχημικούς δείκτες και συγκεκριμένα με την φερριτίνη, την ασπαρτική τρανσαμινάση και την τρανσαμινάση της αλανίνης⁽¹²⁰⁾.

Εφαρμόστηκαν μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την εξαγωγή συμπερασμάτων για την συσχέτιση των διαφόρων μεταβλητών στα επίπεδα του microRNA και κατασκευάστηκαν τρία μοντέλα. Στο πρώτο μοντέλο δεν έγινε διόρθωση για τις μεταβλητές που μπορεί να επηρεάζουν την συσχέτιση, στο δεύτερο πραγματοποιήθηκαν διορθώσεις για την ηλικία το φύλο και το BMI και στο τρίτο πραγματοποιήθηκαν διορθώσεις, για το BMI, το φύλο, την ηλικία και την λήψη φαρμάκων για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II. Τα επίπεδα της ινσουλίνης διατήρησαν την συσχέτιση τους με τα επίπεδα του microRNA (CT) στο μοντέλο 1 και στο μοντέλο 2 αλλά αυτή η σχέση εξαλείφθηκε στο μοντέλο 3 που πραγματοποιήθηκε διόρθωση και για την λήψη φαρμάκων.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη, εκφρασμένη με το HOMA-IR, διατήρησε την συσχέτιση της με τα επίπεδα του microRNA (CT) και στα τρία μοντέλα.

Τέλος, καμία από τις άλλες μεταβλητές που είχαν συσχετιστεί με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p δεν διατήρησαν την σχέση αυτή στα διορθωμένα μοντέλα (Μοντέλο 2 και Μοντέλο 3). Η σχέση της αντίστασης στην ινσουλίνη και των επιπέδων της ινσουλίνης με τα επίπεδα του hsa-miR-21-5p μπορεί να ερμηνευθεί μερικώς, μέσω της συμμετοχής του hsa-miR-21-5p στο σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Το microRNA-21 έχει ως στόχο την πρωτεΐνη PTEN και αναστέλλει την έκφραση της. Η PTEN αναστέλλει την φωσφορυλίωση της AKT, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ^{(106),(108)}. Επιπλέον, τα επίπεδα του microRNA-21 έχουν παρατηρηθεί αυξημένα μετά την ενεργοποίηση του NF-κΒ⁽¹⁰⁷⁾. Έτσι, μέσω της αναστολής της έκφρασης της PTEN το microRNA-21 προάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ καθώς και την μεταγραφή γονιδίων που ελέγχει ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας. Ο NF-κΒ έχει συσχετιστεί με την αντίσταση στην ινσουλίνη σε πειραματόζωα και αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ της φλεγμονής και της αντίστασης στην ινσουλίνη^{(126),(127)}. Επιπλέον, κάποιες μελέτες συνδέουν την έκφραση της PTEN με βελτιωμένη απόκριση στην ινσουλίνη⁽¹²⁸⁾, όμως υπάρχουν και πειραματικά δεδομένα για το αντίθετο^{(126),(127)}. Η διαταραγμένη έκφραση του microRNA-21 έχει επίσης συσχετιστεί ιστοειδικά στους νεφρούς και στον αμφιβληστροειδή σε πειραματόζωα με διαβήτη τύπου II^{(128),(129)} καθώς και στον κερατοειδή χιτώνα ασθενών με

διαβήτη τύπου II⁽¹³⁰⁾. Επιπρόσθετα, μία μελέτη ανέδειξε τον ρόλο του miRNA-21 στην μείωση της γλυκονεογένεσης μέσω της αναστολής της έκφρασης του FOXO1⁽¹³¹⁾.

5.2 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μία αύξηση των επιπέδων του has-miR-21-5p στο πλάσμα ασθενών με NASH αλλά όχι σε ασθενείς με NAFLD. Αυτό το αποτέλεσμα καταδεικνύει την πιθανή χρήση του microRNA-21 ως προγνωστικό δείκτη της έκβασης της νόσου, αλλά και ως έναν μη επεμβατικό διαγνωστικό δείκτη για τη διάκριση μεταξύ NAFLD και NASH με την προϋπόθεση να επιβεβαιωθεί από περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερους πληθυσμούς.

Επιπλέον, αναδείχθηκε μία πιθανή εμπλοκή του miRNA-21 στην ομοιόσταση της ινσουλίνης και της γλυκόζης και στην προαγωγή της αντίστασης στην ινσουλίνη, πιθανόν μέσω της ρύθμισης της έκφρασης της PTEN. Όμως, υπάρχουν μελέτες που δεν είναι σε συμφωνία με το αποτέλεσμα αυτό και για αυτό καθίσταται απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης για τον ρόλο του miRNA-21 στην σηματοδότηση της ινσουλίνης, για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

5.3 Περιορισμοί

Ο βασικός περιορισμός της παρούσας διπλωματικής διατριβής είναι ο αριθμός του δείγματος που υπήρξε μικρός (N=64). Έναν ακόμα περιορισμό, αποτελεί το γεγονός ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο στο πλάσμα του αίματος και όχι και σε ηπατικά κύτταρα για την καλύτερη κατανόηση της διακύμανσης της έκφρασης του hsa-miR-21-5p, καθώς η NAFLD και η NASH αποτελούν νόσους του ήπατος.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438 [PMID: 7382552]
2. Kanwar P, Kowdley KV. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2016; 20: 225-243 [PMID: 27063266 DOI: 10.1016/j.cld.2015.10.002]
3. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. [Nat Rev Gastroenterol Hepatol](#). 2013 Nov;10(11):686-90. doi: 10.1038/nrgastro.2013.171. Epub 2013 Sep 17
4. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The Natural Course of Non- Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2016; 17: pii: E774 [PMID: 27213358 DOI: 10.3390/ijms17050774]
5. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease *Liver Int*. 2017 Jan;37 Suppl 1:81-84. doi: 10.1111/liv.13299.
6. Katherine JP Schwenger, Johane P Allard. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease [World J Gastroenterol](#). 2014 Feb 21; 20(7): 1712–1723. Published online 2014 Feb 21. doi: [10.3748/wjg.v20.i7.1712](#)
7. Abdelmalek MF, [Suzuki A](#), [Guy C](#), [Unalp-Arida A](#), [Colvin R](#), [Johnson RJ](#), [Diehl AM](#). Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. [Hepatology](#). 2010 Jun;51(6):1961-71. doi: 10.1002/hep.23535.
8. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. [Hepatology](#). 2016 Jul;64(1):73-84. doi: 10.1002/hep.28431. Epub 2016 Feb 22.
9. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13: 511–31. doi: 10.1016/j.cld.2009.07.005.
10. Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci* 2014;15:8591–638. doi: 10.3390/ijms15058591.

11. C. P. Day and O. F. W. James, Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology*, vol. 114, no. 4 I, pp. 842–845, 1998. Doi :10.1016/S0016-5085(98)70599-2
12. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016;65(8):1038–48. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012. Epub 2016 Jan 4.
13. Holt, H.B., Wild, S.H., Wood, P.J. et al. *Diabetologia* (2006) 49: 141. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0070-x>
14. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010;51:679–89. doi: 10.1002/hep.23280.
15. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793–801. DOI: [10.1172/JCI29069](https://doi.org/10.1172/JCI29069).
16. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23:201–29. DOI: [10.1210/edrv.23.2.0461](https://doi.org/10.1210/edrv.23.2.0461).
17. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343-1351. DOI: 10.1172/JCI23621.
18. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52(2):774–88. doi: 10.1002/hep.23719.
19. Puri P, Baillie RA, Wiest M, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liverdisease. *Hepatology* 2007;46:1081–90. DOI: [10.1002/hep.21763](https://doi.org/10.1002/hep.21763).
20. Maloney E, Sweet IR, Hockenbery DM, et al. Activation of NF-κB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(9):1370–5. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.188813. Epub 2009 Jun 18.

21. Caballero F, Fernandez A, De Lacy AM, et al. Enhanced free cholesterol, REBP-2 and star expression in human NASH. *J Hepatol* 2009;50:789–96. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.188813. Epub 2009 Jun 18.
22. Garbarino J, Sturley SL. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:110–6. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283218.
23. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, et al. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:14205–18. doi: 10.3748/wjg.v20.i39.14205.
24. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005;42:928–40. DOI: [10.1016/j.jhep.2005.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.03.004)
25. Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D, et al. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006;6:1–28. DOI: [10.1016/j.mito.2005.10.004](https://doi.org/10.1016/j.mito.2005.10.004)
26. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, et al. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:568–76. DOI: [10.1053/j.gastro.2007.10.039](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.039)
27. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006;43:163–72. DOI: [10.1002/hep.20999](https://doi.org/10.1002/hep.20999)
28. Herbert Tilg, R. Moschen. Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis *Hepatology* 2010;52:1836-1846. DOI: [10.1002/hep.24001](https://doi.org/10.1002/hep.24001)
29. Kim KH, Lee MS. Pathogenesis and Hormone-Based Therapy of NASH [Front Endocrinol \(Lausanne\)](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00485). 2018 Aug 24;9:485. doi: 10.3389/fendo.2018.00485. eCollection 2018.
30. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:753–766. DOI: [10.1038/nri2858](https://doi.org/10.1038/nri2858).
31. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*. Feb 2010;59:347–357. doi: 10.2337/db09-0016. Epub 2009 Nov 23.

32. Tateya S, Rizzo NO, Handa P, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Daum G, Clowes AW, Morton GJ, Schwartz MW, Kim F. Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. *Diabetes*. 2011;60:2792–2801 doi: 10.2337/db11-0255. Epub 2011 Sep 12.
33. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology* 2010;139:323–34.e7 doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.052. Epub 2010 Mar 27.
34. Stienstra R, Saudale F, Duval C, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* 2010;51:511–22. doi: 10.1002/hep.23337.
35. Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6(3):343–68. doi: 10.1586/14779072.6.3.343.
36. Basanroglu M, Basanroglu G, Bugianesi E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2015;4(2):109–16. doi: [10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.05](https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.05)
37. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2016;61:1282–93. doi: 10.1007/s10620-016-4054-0. Epub 2016 Feb 8.
38. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2005;2:5. DOI: [10.1186/1743-7075-2-5](https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-5).
39. [de Wit N](#), [Derrien M](#), [Bosch-Vermeulen H](#), [Oosterink E](#), [Keshtkar S](#), [Duval C](#), [de Vogel-van den Bosch J](#), [Kleerebezem M](#), [Müller M](#), [van der Meer R](#). Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303(5):G589–99. doi: 10.1152/ajpgi.00488.2011. Epub 2012 Jun 14.
40. [Summers LK](#), [Fielding BA](#), [Bradshaw HA](#), [Ilic V](#), [Beysen C](#), [Clark ML](#), [Moore NR](#), [Frayn KN](#).. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia* 2002;45(3):369–77. DOI: [10.1007/s00125-001-0768-3](https://doi.org/10.1007/s00125-001-0768-3)

41. Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009;49:1877–87. doi: 10.1002/hep.22848
42. . [Wigg AJ](#), [Roberts-Thomson IC](#), [Dymock RB](#), [McCarthy PJ](#), [Grose RH](#), [Cummins AG](#). The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206–11. doi: [10.1136/gut.48.2.206](#)
43. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001;81:1031–64. DOI: [10.1152/physrev.2001.81.3.1031](#)
44. Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225:320–4. PMID: 6842395
45. Geerts A. History, heterogeneity, developmental, biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Sem Liver Dis.* 2001;21:311–335. DOI: [10.1055/s-2001-17550](#)
46. Carpino G, Franchitto A, Morini S, Corradini SG, Merli M, Gaudio E. Activated hepatic stellate cells in liver cirrhosis: a morphologic and morphometrical study. *It J Anat Embryol.* 2004;109:225–238. PMID:15717457
47. Friedman SL The cellular basis of hepatic fibrosis- mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med.* 1993;328:1828–1835. DOI: 10.1056/NEJM199306243282508
48. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Amelioration of liver fibrogenesis by dual inhibition of PDGF and TGF- β with combination of Imatinib mesylate and ACE inhibitor in rats. *Int J Mol Med.* 2006;17:899–904. PMID: 16596278
49. Elizabeth K. Speliotes, Johannah L. Butler, Cameron D. Palmer, Benjamin F. Voight, and Joel N. Hirschhorn. PNPLA3 Variants Specifically Confer Increased Risk for Histologic Nonalcoholic Fatty Liver Disease But Not Metabolic Disease [Hepatology. 2010 Sep; 52\(3\): 904–912.](#) doi: [10.1002/hep.23768](#)
50. [Mahdessian H](#), [Taxiarchis A](#), [Popov S](#), [Silveira A](#), [Franco-Cereceda A](#), [Hamsten A](#), [Eriksson P](#), [van't Hooft F](#). TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride

- secretion and hepatic lipid droplet content. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2014 Jun 17;111(24):8913-8. doi: 10.1073/pnas.1323785111. Epub 2014 Jun 4.
51. [Goffredo M](#), [Caprio S](#), [Feldstein AE](#), [D'Adamo E](#), [Shaw MM](#), [Pierpont B](#), [Savoye M](#), [Zhao H](#), [Bale AE](#), [Santoro N](#). Role of the *TM6SF2* rs58542926 in the pathogenesis of non-alcoholic pediatric fatty liver disease (NAFLD): a multiethnic study [Hepatology](#). 2016 Jan; 63(1): 117–125. doi: 10.1002/hep.28283. Epub 2015 Nov 16.
 52. [Anstee QM](#), [Seth D](#), [Day CP](#). Genetic Factors That Affect Risk of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. [Gastroenterology](#). 2016 Jun;150(8):1728-1744.e7. doi:10.1053/j.gastro.2016.01.037. Epub 2016 Feb 10
 53. [Dongiovanni P](#), [Valenti L](#), [Rametta R](#), [Daly AK](#), [Nobili V](#), [Mozzi E](#), [Leathart JB](#), [Pietrobattista A](#), [Burt AD](#), [Maggioni M](#) et al. Genetic variants regulating insulin receptor signalling are associated with the severity of liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. [Gut](#). 2010 Feb;59(2):267-73. doi: 10.1136/gut.2009.190801.
 54. [Lin YC](#)¹, [Chang PF](#), [Chang MH](#), [Ni YH](#). Genetic variants in GCKR and PNPLA3 confer susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in obese individuals. [Am J Clin Nutr](#). 2014 Apr;99(4):869-74. doi: 10.3945/ajcn.113.079749. Epub 2014 Jan 29.
 55. [Vazquez-Chantada M](#), [Gonzalez-Lahera A](#), [Martinez-Arranz I](#), [Garcia-Monzon C](#), [Regueiro MM](#), [Garcia-Rodriguez JL](#), [Schlangen KA](#), [Mendibil I](#), [Rodriguez-Ezpeleta N](#), [Lozano JJ](#) et al. Solute carrier family 2 member 1 is involved in the development of nonalcoholic fatty liver disease. [Hepatology](#). 2013 Feb;57(2):505-14. doi: 10.1002/hep.26052. Epub 2012 Nov 27.
 56. [Min-Rui Li](#), [Sheng-Hong Zhang](#), [Kang Chao](#), [Xian-Hua Liao](#), [Jia-Yan Yao](#), [Min-Hu Chen](#), and [Bi-Hui Zhong](#). Apolipoprotein C3 (-455T>C) polymorphism confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in the Southern Han Chinese population. [World J Gastroenterol](#) 2014 October 14; 20(38): 14010-14017. doi: [10.3748/wjg.v20.i38.14010](#)
 57. [Ye Q](#), [Qian BX](#), [Yin WL](#), [Wang FM](#), [Han T](#). Association between the HFE C282Y, H63D Polymorphisms and the Risks of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of 5,758 Cases and 14,741 Controls. [PLoS One](#). 2016 Sep 22;11(9):e0163423. DOI: 10.1371/journal.pone.0163423. eCollection 2016.

58. [Al-Serri A](#), [Anstee QM](#), [Valenti L](#), [Nobili V](#), [Leathart JB](#), [Dongiovanni P](#), [Patch J](#), [Fracanzani A](#), [Fargion S](#), [Day CP](#), [Daly AK](#). The SOD2 C47T polymorphism influences NAFLD fibrosis severity: evidence from case-control and intra-familial allele association studies. [J Hepatol](#). 2012 Feb;56(2):448-54. doi: 10.1016/j.jhep.2011.05.029. Epub 2011 Jul 12.
59. [Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira](#), [José Tadeu Stefano](#), [Ana Mercedes Cavaleiro](#), [Maria Angela Henriques Zanella Fortes](#), [Suzana Maria Vieira](#), [Vicência Mara Rodrigues Lima](#). Association of polymorphisms of glutamate-cystein ligase and microsomal triglyceride transfer protein genes in non-alcoholic fatty liver disease. [Journal of Gastroenterology and Hepatology](#). Feb 2010 [Volume25](#), [Issue2](#) Pages 357-361. DOI:[10.1111/j.1440-1746.2009.06001.x](#)
60. [Chao Sun](#), [Jian-Gao Fan](#), [Liang Qiao](#). Potential Epigenetic Mechanism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.[Int J Mol Sci](#). 2015 Mar; 16(3): 5161–5179. doi: [10.3390/ijms16035161](#)
61. [Sookoian S](#), [Rosselli MS](#), [Gemma C](#), [Burgueño AL](#), [Fernández Gianotti T](#), [Castaño GO](#), [Pirola CJ](#). Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha promoter. [Hepatology](#) 2010;52:1992–2000. doi: 10.1002/hep.23927. Epub 2010 Oct 1.
62. [Murphy SK](#), [Yang H](#), [Moylan CA](#), [Pang H](#), [Dellinger A](#), [Abdelmalek MF](#), [Garrett ME](#), [Ashley-Koch A](#), [Suzuki A](#), [Tillmann HL](#) et al. Relationship Between Methylome and Transcriptome in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. [Gastroenterology](#) 2013, 145, 1076–1087. doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.047. Epub 2013 Jul 31.
63. Kim H, Mendez R, Chen X, Fang D, Zhang K. Lysine Acetylation of CREBH Regulates Fasting-Induced Hepatic Lipid Metabolism. [Mol. Cell. Biol.](#) 2015, 35, 4121–4134. doi: [10.1128/MCB.00665-15](#).
64. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF-κB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. [Kauppinen A Cell Signal](#). 2013 Oct;25(10):1939-48. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.06.007. Epub 2013 Jun 11.
65. Matthew D. Hirschey, Tadahiro Shimazu, Enxuan Jing, Carrie A. Grueter, Amy M. Collins, Bradley Aouizerat, Alena Stančáková, Eric Goetzman, Maggie M. Lam, Bjoern Schwer et al. SIRT3 Deficiency and Mitochondrial Protein Hyperacetylation Accelerate the

Development of the Metabolic Syndrome. *Mol cell* Volume 44, Issue 2, 21 October 2011, Pages 177-190. doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.019

66. Pogribny IP1, Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, Han T, Ross SA, Rusyn I, Beland FA. Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Lab Invest*. 2010 Oct;90(10):1437-46. doi: 10.1038/labinvest.2010.113. Epub 2010 Jun 14.
67. Alisi A1, Da Sacco L, Bruscalupi G, Piemonte F, Panera N, De Vito R, Leoni S, Bottazzo GF, Masotti A, Nobili V. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest*. 2011 Feb;91(2):283-93. doi: 10.1038/labinvest.2010.166. Epub 2010 Oct 18.
68. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*. 2006 Feb;3(2):87-98. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.01.005
69. Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2871-83. doi: 10.1172/JCI63539. Epub 2012 Jul 23.
70. Csak T, Bala S, Lippai D, Kodys K, Catalano D, Iracheta-Vellve A, Szabo G. MicroRNA-155 deficiency attenuates liver steatosis and fibrosis without reducing inflammation in a mouse model of steatohepatitis. *PLoS One*. 2015 Jun 4;10(6):e0129251. doi: 10.1371/journal.pone.0129251. eCollection 2015.
71. Glenn S Gerhard. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver *World J Hepatol* 2015 February 27; 7(2): 226-234. DOI: 10.4254/wjh.v7.i2.226
72. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016; 64: 1388-1402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004.
73. L. A. Adams and P. Angulo. Role of liver biopsy and serum markers of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2007 Feb;11(1):25-35, viii. DOI: 10.1016/j.cld.2007.02.004
74. Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Sep 1;28(5):503-22. doi: 10.1111/j.1365-2036.2008.03752.x. Epub 2008 Jun 3

75. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21. DOI: 10.1002/hep.20701
76. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002 Sep;123(3):745-50. PMID: 12198701
77. Naim Alkhoury, MD, and Arthur J. McCullough, MD. Noninvasive Diagnosis of NASH and Liver Fibrosis Within the Spectrum of NAFLD. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2012 Oct; 8(10): 661–668. PMID: 24683373.
78. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, Fontaine H, Pol S. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and Fibrotest. *Hepatology*. 2007 Jul;46(1):32-6. DOI: 10.1002/hep.21669.
79. Simona Leoni, Francesco Tovoli, Lucia Napoli, Ilaria Serio, Silvia Ferri, Luigi Bolondi. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 2018 Aug 14; 24(30): 3361–3373. Published online 2018 Aug 14. doi: 10.3748/wjg.v24.i30.3361.
80. R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. PMID: 8252621.
81. Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008 Sep 1;79(4):581-8. doi: 10.1093/cvr/cvn156. Epub 2008 Jun 11.
82. N.C. Lau, P.L. Lim, E.G. Weinstein, D.P. Bartel. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858-62. DOI: 10.1126/science.1065062.
83. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V.N. Kim, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9. DOI: 10.1038/nature01957.
84. X. Cai, C.H. Hagedorn, B.R. Cullen. Human MicroRNAs are processed from capped polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957-66. Epub 2004 Nov 3. DOI: 10.1261/rna.7135204.

85. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Nov;1803(11):1231-43. Doi 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013. Epub 2010 Jul 7.
86. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8. DOI: 10.1126/science.1064921.
87. X. Cai, C.H. Hagedorn, B.R. Cullen. Human MicroRNAs are processed from capped polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957-66. Epub 2004 Nov 3. DOI: 10.1261/rna.7135204.
88. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermüller J, Kretzschmar AK, Burger R, Gramatzki M, Blumert C, Bauer K, Cvijic H. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1330-3. Epub 2007 May 11. DOI: 10.1182/blood-2007-03-081133.
89. Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, Iba H. miR-21 gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*. 2008 May 2;378(3):492-504. doi: 10.1016/j.jmb.2008.03.015. Epub 2008 Mar 15.
90. Mudduluru G, George-William JN, Muppala S, Asangani IA, Kumarswamy R, Nelson LD, Allgayer H. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci Rep*. 2011 Jun;31(3):185-97. doi: 10.1042/BSR20100065.
91. Zhang BG, Li JF, Yu BQ, Zhu ZG, Liu BY, Yan M. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):1019-26. doi: 10.3892/or.2012.1645. Epub 2012 Jan 19.
92. Reis ST1, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'Oglio MF, Dip N, Passerotti CC, Rossini GA, Morais DR, Nesrallah AJ, Piantino C, Srougi M, Leite KR. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. *BMC Urol*. 2012 May 29;12:14. doi: 10.1186/1471-2490-12-14.
93. Li T, Leong MH, Harms B, Kennedy G, Chen L. MicroRNA-21 as a potential colon and rectal cancer biomarker *World J Gastroenterol*. 2013 Sep 14; 19(34): 5615–5621. doi: 10.3748/wjg.v19.i34.5615.
94. Ashish Saxena, Mohammad Shoeb, Kota V. Ramana, and Satish K Srivastava. Aldose reductase inhibition suppresses colon cancer cell viability by modulating miR-21 mediated

- PDCD4 expression. *Eur J Cancer*. 2013 Oct; 49(15): 3311–3319. Published online 2013 Jul 1. doi: 10.1016/j.ejca.2013.05.031.
95. Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S., Allgayer, H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008 Apr 3;27(15):2128-36. Epub 2007 Oct 29 DOI: 10.1038/sj.onc.1210856.
 96. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065-70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.
 97. Ashish Saxena, Mohammad Shoeb, Kota V. Ramana, and Satish K Srivastava. Aldose reductase inhibition suppresses colon cancer cell viability by modulating miR-21 mediated PDCD4 expression *Eur J Cancer*. 2013 Oct; 49(15): 3311–3319. Published online 2013 Jul 1. doi: 10.1016/j.ejca.2013.05.031.
 98. Xu LF, Wu ZP, Chen Y, Zhu QS, Hamidi S, Navab R. MicroRNA-21 (miR-21) Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by Targeting PTEN , RECK and Bcl-2 in Lung Squamous Carcinoma, Gejiu City, China. *PLoS One*. 2014 Aug 1;9(8):e103698. doi: 10.1371/journal.pone.0103698. eCollection 2014.
 99. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 2008 Mar;18(3):350-9. doi: 10.1038/cr.2008.24.
 100. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 2008 Jul 17;27(31):4373-9. doi: 10.1038/onc.2008.72. Epub 2008 Mar 31.
 101. Zhu, S.; Si, M. L.; Wu, H.; Mo, Y. Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). [J Biol Chem](#). 2007 May 11;282(19):14328-36. Epub 2007 Mar 15.
 102. Chan JA, Krichevsky AM and Kosik KS: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. [Cancer Res](#). 2005 Jul 15;65(14):6029-33. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-05-0137](#)
 103. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY.: MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. [RNA](#). 2008 Nov;14(11):2348-60. doi: 10.1261/rna.1034808. Epub 2008 Sep 23. DOI:[10.1261/rna.1034808](#)

104. [Qingmin Wang](#), [Shupeng Liu](#), [Ying Tang](#), [Qiuhong Liu](#), and [Yongjie Yao](#). MPT64 Protein from Mycobacterium tuberculosis Inhibits Apoptosis of Macrophages through NF- κ B-miRNA21-Bcl-2 Pathway. [PLoS One](#). 2014; 9(7): e100949. doi: [10.1371/journal.pone.0100949](#)
105. [Meng F](#), [Henson R](#), [Wehbe-Janek H](#), [Ghoshal K](#), [Jacob ST](#), [Patel T](#). MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. [Gastroenterology](#). 2007 Aug;133(2):647-58. Epub 2007 May 21. DOI: [10.1053/j.gastro.2007.05.022](#)
106. [Wu Y](#), [Song Y](#), [Xiong Y](#), [Wang X](#), [Xu K](#), [Han B](#), [Bai Y](#), [Li L](#), [Zhang Y](#), [Zhou L](#). MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer Cell Physiol Biochem. 2017;43(3):945-958. doi: 10.1159/000481648. Epub 2017 Sep 29
107. Jixiao Niu, Yuling Shi, Guangyun Tan, Chuan He Yang, Meiyun Fan, Lawrence M. Pfeffer, and Zhao-Hui Wu. DNA Damage Induces NF- κ B-dependent MicroRNA-21 Up-regulation and Promotes Breast Cancer Cell Invasion J Biol Chem. 2012 Jun 22; 287(26): 21783–21795. Published online 2012 Apr 30. doi: 10.1074/jbc.M112.355495
108. Choudhury SN, Li Y1. miR-21 and let-7 in the Ras and NF- κ B pathways. *Microna*. 2012;1(1):65-9.
109. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. 1990 Apr;10(4):1498-506.
110. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation Toby Lawrence. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001651 PMCID:[PMC362253](#)
111. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, [Shoelson SE](#). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. [Nat Med](#). 2005 Feb;11(2):183-90. Epub 2005 Jan 30. DOI:[10.1038/nm1166](#)
112. [Rodrigues PM](#), [Afonso MB](#), [Simão AL](#), [Carvalho CC](#), [Trindade A](#), [Duarte A](#), [Borralho PM](#), [Machado MV](#), [Cortez-Pinto H](#), [Rodrigues CM](#), [Castro RE](#). miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. [Cell Death Dis](#). 2017 Apr 13;8(4):e2748. doi: 10.1038/cddis.2017.172.
113. [Loyer X](#), [Paradis V](#), [Hénique C](#), [Vion AC](#), [Colnot N](#), [Guerin CL](#), [Devue C](#), [On S](#), [Scetbun J](#), [Romain M](#). Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting

- PPARalpha expression. [Gut](#). 2016 Nov;65(11):1882-1894. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308883. Epub 2015 Sep 3.
114. [Calo N](#), [Ramadori P](#), [Sobolewski C](#), [Romero Y](#), [Maeder C](#), [Fournier M](#), [Rantakari P](#), [Zhang FP](#), [Poutanen M](#) et al. Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. [Gut](#). 2016 Nov;65(11):1871-1881. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310822. Epub 2016 May 24.
 115. Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballería J and García-Ruiz C: [J Hepatol](#). 2009 Apr;50(4):789-96. doi: 10.1016/j.jhep.2008.12.016. Epub 2009 Jan 14. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH.
 116. [Sun C](#), [Huang F](#), [Liu X](#), [Xiao X](#), [Yang M](#), [Hu G](#), [Liu H](#), [Liao L](#), miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. [Int J Mol Med](#). 2015 Mar;35(3):847-53. doi: 10.3892/ijmm.2015.2076. Epub 2015 Jan 21.
 117. [Ahn J](#), [Lee H](#), [Jung CH](#), [Ha T](#). Lycopene inhibits hepatic steatosis via microRNA-21-induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet. [Mol Nutr Food Res](#). 2012 Nov;56(11):1665-74. doi: 10.1002/mnfr.201200182. Epub 2012 Sep 12.
 118. [Cermelli S](#), [Ruggieri A](#), [Marrero JA](#), [Ioannou GN](#), [Beretta L](#). Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. [PLoS One](#). 2011;6(8):e23937. doi: 10.1371/journal.pone.0023937. Epub 2011 Aug 23.
 119. [Yamada H](#), [Suzuki K](#), [Ichino N](#), [Ando Y](#), [Sawada A](#), [Osakabe K](#), [Sugimoto K](#), [Ohashi K](#), [Teradaira R](#), [Inoue T](#), [Hamajima N](#), [Hashimoto S](#). Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. [Clin Chim Acta](#). 2013 Sep 23;424:99-103. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.021. Epub 2013 May 30
 120. [Mireia López-Riera](#), [Isabel Conde](#), [Guillermo Quintas](#), [Laia Pedrola](#), [Ángela Zaragoza](#), [Judith Perez-Rojas](#), [Mario Salcedo](#), [Salvador Benlloch](#), [José V. Castell](#), and [Ramiro Jover](#). Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. [Sci Rep](#). 2018; 8: 10606. Published online 2018 Jul 13. doi: [10.1038/s41598-018-28854-4](#)
 121. [Sourvinou IS](#), [Markou A](#), [Lianidou ES](#). Quantification of Circulating miRNAs in Plasma Effect of Preanalytical and Analytical Parameters on Their Isolation and Stability [J](#)

- [Mol Diagn](#). 2013 Nov;15(6):827-34. doi: 10.1016/j.jmoldx.2013.07.005. Epub 2013 Aug 27.
122. Pauline Chugh and Dirk P. Dittmer Potential Pitfalls in microRNA Profiling. [Wiley Interdiscip Rev RNA](#). 2012 Sep-Oct;3(5):601-16. doi: 10.1002/wrna.1120. Epub 2012 May 7.
 123. [Arkan MC](#), [Hevener AL](#), [Greten FR](#), [Maeda S](#), [Li ZW](#), [Long JM](#), [Wynshaw-Boris A](#), [Poli G](#), [Olefsky J](#), [Karin](#). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. [Nat Med](#). 2005 Feb;11(2):191-8. Epub 2005 Jan 30. DOI: [10.1038/nm1185](#)
 124. S. K. Yekollu, R. Thomas, and B. O'Sullivan, Targeting curcucosomes to inflammatory dendritic cells inhibits NF- κ B and improves insulin resistance in obese mice, *Diabetes*, vol. 60, no. 11, pp. 2928–2938, 2011.
 125. Ana Ortega-Molina, Manuel Serrano¹ et al Pten Positively Regulates Brown Adipose Function, Energy Expenditure, and Longevity Cell Metab. 2012 Mar 7;15(3):382-94. doi: 10.1016/j.cmet.2012.02.001.
 126. Li A1, Qiu M1, Zhou H2, Wang T3, Guo W2. PTEN, Insulin Resistance and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2017;23(25):3667-3676. doi: 10.2174/1381612823666170704124611.
 127. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity Stiles B *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):2082-7. Epub 2004 Feb 9.
 128. Johan M. Lorenzen Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice *Mol Ther*. 2017 Jan 4; 25(1): 165–180. PMID: 14769918 PMCID: PMC357055 DOI: 10.1073/pnas.0308617100
 129. Jian-xing Ma Pathogenic Role of microRNA-21 in Diabetic Retinopathy Through Downregulation of PPAR α *Diabetes*. 2017 Jun; 66(6): 1671–1682 PMCID: PMC5440012 PMID: 28270521 doi: 10.2337/db16-1246
 130. Liang YZ Identification of stress-related microRNA biomarkers in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes*. 2018 Jan 17. doi: 10.1111/1753-0407.12643. PMID: 29341487
 131. Ailing Luo, Haibo Yan, Jichao Liang, Chunyuan Du, Xuemei Zhao, Lijuan Sun, Yong Chen , MicroRNA-21 regulates hepatic glucose metabolism by targeting FOXO1, *Gene* (2017), doi: 10.1016/j.gene.2017.06.024

