



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**Μελέτη του λιπιδαιμικού προφίλ και της σύστασης της HDL  
λιποπρωτεΐνης σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του  
ήπατος**

**Καρτσώλη Σοφία**

**Ιατρός**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Οκτώβριος 2019**

### **Μέλη τριμελούς επιτροπής:**

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χριστοδούλου Δημήτριος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσιμιχόδημος Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

*Στους γονείς μου, Δημήτρη και Γιώτα*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς και στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Χημεία».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κ. Ελένη Μπαϊρακτάρη για την συνεχή επίβλεψη, καθοδήγηση και την ουσιαστική συμμετοχή της στην ερευνητική διαδικασία. Εν συνεχεία, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Γαστρεντερολογίας κ. Δημήτριο Χριστοδούλου για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την δυνατότητα μετεκπαίδευσης μου στο Ηπατολογικό Ιατρείο του Π.Γ.Ν.Ι. και την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπο μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Αναπλ. Καθηγητή Παθολογίας κ. Βασίλειο Τσιμιχόδημο για τις υποδείξεις και διορθώσεις που πρότεινε στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

Η συμβολή της Δρ. Χριστίνας Κωσταρά , πανεπιστημιακού υποτρόφου του Εργαστηρίου κλινικής Χημείας, ήταν καθοριστική και την ευχαριστώ θερμά για την άμεση συνεργασία, την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, Δημήτριο και Γιώτα καθώς και στον αδερφό μου Χάρη, για τη συνεχή υποστήριξη και την αδιάκοπη συμπαράστασή τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1</b>	<b>ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ.....</b>	<b>8</b>
1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.2	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	9
1.3	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ.....	10
1.3.1	<i>Μεταβολικό σύνδρομο (MetS)</i> .....	10
1.3.2	<i>Παχυσαρκία</i> .....	10
1.3.3	<i>Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (Type 2 Diabetes mellitus: T2DM)</i> .....	10
1.3.4	<i>Δυσλιπιδαιμία</i> .....	11
1.3.5	<i>Φύλο και ηλικία</i> .....	11
1.3.6	<i>Δίαιτα και εντερικό μικροβίωμα</i> .....	12
1.3.7	<i>Τρόπος ζωής και κάπνισμα</i> .....	13
1.3.8	<i>Άλλες παθήσεις</i> .....	13
1.4	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ.....	13
1.5	ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	14
1.5.1	<i>Στεάτωση</i> .....	15
1.5.2	<i>Μηχανισμοί που οδηγούν στο κυτταρικό θάνατο των ηπατοκυττάρων</i> .....	16
1.5.3	<i>Φλεγμονή/Στεατοηπατίτις</i> .....	16
1.5.4	<i>Ο ρόλος των λιπιδίων στη φλεγμονή</i> .....	17
1.5.5	<i>Ο ρόλος του λιπώδους ιστού στη φλεγμονή- Αδipoκίνες</i> .....	18
1.5.6	<i>Ο ρόλος του εντερικού μικροβιώματος στη χρόνια φλεγμονή</i> .....	18
1.6	ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΗΠΑΤΟΣ.....	19
1.7	ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ NAFLD - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	20
<b>2</b>	<b>ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ NAFLD</b>	<b>21</b>
2.1	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ NAFLD.....	21
2.2	ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ NASH. 21	
2.3	ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΙΝΩΣΗΣ.....	23
<b>3</b>	<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ - LIPIDOMICS</b>	<b>24</b>
<b>ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ</b>	<b>.....</b>	<b>24</b>
3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	24
3.2	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	27
3.3	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD.....	30
<b>4</b>	<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>31</b>
4.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
4.1.1	<i>Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή δειγμάτων</i> .....	31
4.1.2	<i>Εργαστηριακός εξοπλισμός και απαιτούμενα αντιδραστήρια</i> .....	31
4.2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	32

4.2.1	Αρχή μεθόδου καταβύθισης των λιποπρωτεϊνών - Απομόνωση των HDL λιποπρωτεϊνών.....	32
4.2.2	Εκχύλιση λιπιδίων.....	33
4.2.3	Προεργασία δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H NMR}$ .....	34
4.2.4	Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H NMR}$ .....	34
<b>5</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>36</b>
5.1.1	Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών. 36	
5.2	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	37
5.2.1	Λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών των ασθενών με NAFLD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.....	37
5.2.2	Λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών των ασθενών με NAFLD και ασθενών με Εγκατεστημένη Καρδιαγγειακή Νόσο.....	39
<b>6</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>50</b>

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>NAFLD</b>	Non-alcoholic fatty liver disease
<b>NAFL</b>	Non-alcoholic fatty liver
<b>NASH</b>	Non-alcoholic steatohepatitis
<b>HCC</b>	Hepatocellular carcinoma
<b>SHIP</b>	Study of Health in Pomerania
<b>MetS</b>	Metabolic syndrome
<b>HDL</b>	High density lipoprotein
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>ASSLD</b>	American Association for the Study of Liver Disease
<b>POCS</b>	Polycystic Ovarian syndrome
<b>OSA</b>	Obstructive sleep apnea
<b>PNPLA3</b>	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
<b><sup>1</sup>H-MRS</b>	In vivo magnetic resonance spectroscopy
<b>HTGC</b>	Hepatic triglyceride content
<b>FFA</b>	Free fatty acids
<b>DNL</b>	De novo lipogenesis
<b>IR</b>	Insulin resistance
<b>SREBP-1c</b>	Sterol regulatory element binding protein-1c
<b>ChREBP</b>	Carbohydrate response element binding protein
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>VAT</b>	Visceral adipose tissue
<b>RS</b>	Endoplasmic reticulum stress

# 1 ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

---

## 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος αποτελεί πλέον την πιο συχνή αιτία χρόνιας ηπατικής νόσου και η επίπτωσή της έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες.

Ο όρος μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα φάσμα ιστολογικών ευρημάτων που ποικίλει από την απλή στεάτωση (non-alcoholic fatty liver: NAFL) μέχρι την μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (non-alcoholic steatohepatitis :NASH) με προοδευτική ίνωση, κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια (1). Η διαταραχή χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λίπους κυρίως με τη μορφή τριγλυκεριδίων και λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα. Όταν η συσσώρευση αυτή αφορά ποσοστό >5% του παρεγχύματος, χωρίς ένδειξη ηπατοκυτταρικής βλάβης, ορίζεται ως απλή στεάτωση ή λιπώδες ήπαρ (NAFL). Αντίθετα, η NASH ορίζεται από ιστολογικά ευρήματα συμβατά με την ύπαρξη ηπατοκυτταρικής βλάβης και φλεγμονής στο έδαφος της στεάτωσης (1). Η εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση, ενώ η εξέλιξη της NASH σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα έχει επιβεβαιωθεί (2,3).

Η νοσηρότητα και η θνητότητα των ασθενών με NAFLD οφείλεται κυρίως στις καρδιαγγειακές επιπλοκές παρά στην ίδια την ηπατική νόσο (3). Οι πιο συχνές ηπατοσχετιζόμενες αιτίες θνητότητας είναι η κίρρωση και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), ακολουθούμενες από τη συστηματική λοίμωξη. (4) Ιδιαίτερα το HCC σε αυτήν την ομάδα ασθενών έχει τεκμηριωθεί πως εμφανίζεται και επί απουσίας κίρρωσης εγείροντας έτσι προβληματισμό για τη διαχείριση των ασθενών (5). Επιπλέον, η NAFLD αναδεικνύεται σταδιακά ως κύρια αιτία ηπατικής ανεπάρκειας που οδηγεί σε μεταμόσχευση ήπατος στους ενήλικες, ενώ πιστεύεται ότι τα επόμενα χρόνια θα είναι η πρώτη αιτία μεταμόσχευσης (6). Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την μη αλκοολική νόσο του ήπατος με την καρδιαγγειακή νόσο και κάποιες μελέτες τη χαρακτηρίζουν ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου (7).

Η παθογένεια της νόσου φαίνεται να συσχετίζεται με τη συνύπαρξη των πολλαπλών παθολογικών καταστάσεων που χαρακτηρίζουν το μεταβολικό σύνδρομο και γενικά παρατηρείται αυξημένη επίπτωσή της σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, Μεταβολικό Σύνδρομο και παχυσαρκία (1). Για το λόγο αυτό, οι μεταβολικές διαταραχές αλλά κυρίως η αντίσταση στην ινσουλίνη που παρουσιάζουν οι παραπάνω ασθενείς φαίνεται να αποτελούν τους καθοριστικούς παράγοντες της παθοφυσιολογίας της νόσου. Ωστόσο, ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός της νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος και δεν υπάρχει μέχρι και σήμερα αποτελεσματική θεραπεία.



## 1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

---

Σε ό,τι αφορά την επιδημιολογία της νόσου, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει προσπαθήσει να υπολογίσει την πραγματική παγκόσμια επίπτωση της NAFL/NASH, ωστόσο λόγω σημαντικών διαφορών και ανομοιογένειας στο σχεδιασμό αλλά και στις μεθόδους διάγνωσης, ένα αξιόπιστο ποσοστό εμφάνισης είναι δύσκολο να αποδοθεί.

Εντούτοις, ορισμένοι μελετητές έχουν προτείνει πως ο παγκόσμιος επιπολασμός της νόσου εκτιμάται στο ένα 1 δισεκατομμύριο με ποσοστό 24-25% στον γενικό πληθυσμό (8). Το ποσοστό αυτό αρχικά προτάθηκε από τη Dionysos study (9) και πρόσφατα επιβεβαιώθηκε από μία μετα-ανάλυση που περιέγραψε και διαφορές στη γεωγραφική κατανομή της νόσου (10, 11). Τα υψηλότερα ποσοστά έχουν καταγραφεί στη Νότια Αμερική (31%) και στη Μέση Ανατολή (32%), ενώ τα χαμηλότερα στην Αφρική (14%). Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν ο σχετικά υψηλός επιπολασμός της νόσου που παρατηρήθηκε στον Ασιατικό πληθυσμό (27%). Στην Ευρώπη ο επιπολασμός ποικίλλει με βάση το διαγνωστικό μέσο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της νόσου, ωστόσο περίπου το ένα τέταρτο του Ευρωπαϊκού πληθυσμού παρουσιάζει την πάθηση. Μία μετα-ανάλυση, που δημοσιεύθηκε το 2016, αναφέρει πως ο μέσος επιπολασμός στην Ευρώπη είναι 23,7%, και ποικίλλει από 5% έως 44% ανάλογα με τη χώρα. (10)

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί, χρησιμοποίησαν τον υπερηχογραφικό έλεγχο για τη διάγνωση της νόσου και ότι η απεικόνιση δύναται μόνο να ανιχνεύσει το λιπώδες ήπαρ και όχι την παρουσία φλεγμονής και την ίνωση, ο επιπολασμός της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας NASH και της ηπατικής ίνωσης παραμένει αδιευκρίνιστος. Ανάλογα με τα κριτήρια εισαγωγής των ασθενών και τον ορισμό της στεατοηπατίτιδας, ιστολογικές αναλύσεις προτείνουν ότι το 6-55% των ασθενών με NAFLD έχουν NASH. (2) Επιπλέον, οι ασθενείς που θα οδηγηθούν τελικά σε βιοψία ήπατος επιλέγονται αυστηρά και δεν αντιπροσωπεύουν το πληθυσμό της κοινότητας. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν έμμεσες εκτιμήσεις που προκύπτουν από τα ποσοστά της NASH σε NAFLD ασθενείς και τον επιπολασμό της NAFLD στο γενικό πληθυσμό. Σύμφωνα με αυτές τις εκτιμήσεις ο επιπολασμός εκτιμάται στο 3-4% του γενικού πληθυσμού των Η.Π.Α. (11)

Τέλος, με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα για το Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο που αναμένεται να πάρουν μέσα στα επόμενα χρόνια τη μορφή επιδημίας, η συχνότητα της NAFLD υπολογίζεται πως θα αυξηθεί και αυτή αναλογικά (10).

### 1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

---

#### 1.3.1 Μεταβολικό σύνδρομο (MetS)

---

Το μεταβολικό σύνδρομο έχει πλέον αναδειχθεί ως έναν από τους κύριους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος (12). Από δεδομένα μίας μετα-ανάλυσης για επιδημιολογικά δεδομένα εκτιμάται πως το MetS συναντάται στο 42.54% των ασθενών με NAFLD και στο 70.65% των ασθενών με NASH. (10) Το παραπάνω σύνδρομο συνοψίζει σημαντικούς καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου αλλά και προδιαθέτει στην εμφάνιση Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2 και Καρδιαγγειακής Νόσου. (13) Σύμφωνα με το Adult Treatment Panel III ο κλινικός ορισμός του Μεταβολικού συνδρόμου απαιτεί την παρουσία 3 ή περισσότερων από τα εξής χαρακτηριστικά: 1. Περιφέρεια μέσης μεγαλύτερη από 102 cm στους άνδρες και μεγαλύτερη από 88 cm στις γυναίκες. 2. Τριγλυκερίδια > ή ίσα από 150 mg/dL 3. HDL χοληστερόλη <40 mg/dL στους άνδρες και <50 mg/dL στις γυναίκες. 4. Συστολική Αρτηριακή Πίεση 130 mm Hg ή μεγαλύτερη ή διαστολική πίεσης 85 mm Hg ή μεγαλύτερη 5. Γλυκόζη νηστείας 110 mg/dL ή μεγαλύτερη. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η επίπτωση της NAFLD παρατηρείται να αυξάνεται σε συνάρτηση με τα αυξανόμενα ποσοστά του MetS. Μάλιστα, μελέτες έχουν αναδείξει πώς, όσο αυξάνεται ο αριθμός των διαγνωστικών κριτηρίων του MetS, αυξάνεται και η επίπτωση της νόσου (13).

#### 1.3.2 Παχυσαρκία

---

Η παχυσαρκία, τόσο με την έννοια του σημαντικά αυξημένου BMI (Body Mass Index), όσο και με την παρουσία περίσσειας σπλαχνικού λίπους, αποτελεί τον πιο κοινό και καλά μελετημένο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της NAFLD. Σε μεγάλες μελέτες κοόρτης από την Ιταλία η νόσος ανιχνεύθηκε υπερηχογραφικά στο 91% των παχύσαρκων ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), στο 67% των υπέρβαρων ( $BMI 25\text{--}30 \text{ kg/m}^2$ ) και στο 25% των ατόμων με φυσιολογικό BMI ( $BMI 18\text{--}25 \text{ kg/m}^2$ ) (14).

#### 1.3.3 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (Type 2 Diabetes mellitus: T2DM)

---

Έχει παρατηρηθεί πως, όταν έγινε σύγκριση μη διαβητικών με διαβητικούς ασθενείς (με τα ίδια χαρακτηριστικά: ηλικία, φύλο και σωματικό βάρος), η εμφάνιση της NAFLD ήταν 80% υψηλότερη στην ομάδα με ΣΔ τύπου 2 (15). Μάλιστα, εκτιμάται πως το ένα τρίτο μέχρι τα δύο τρίτα των διαβητικών παρουσιάζουν τη νόσο και επιπλέον έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης της NASH (12).

Γενικά, πολλοί ερευνητές κάνουν λόγο για μία πιθανή αμφίδρομη αιτιολογική σχέση μεταξύ της NAFLD και του Σακχαρώδη Διαβήτη, καθώς οι δύο παθήσεις μπορούν να αναπτυχθούν ταυτόχρονα σε έναν ασθενή. Η σχέση αυτή όμως απαιτεί επιπλέον διερεύνηση (16).

#### *1.3.4 Δυσλιπιδαιμία*

Οι συχνότερες ποσοτικές διαταραχές των λιποπρωτεϊνών που παρουσιάζουν οι ασθενείς με NAFLD είναι τα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και τα χαμηλά επίπεδα της HDL λιποπρωτεΐνης στον ορό του αίματος. Παρόλο που δεν αναφέρονται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της LDL, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στους υποπληθυσμούς των LDL σωματιδίων. Οι ασθενείς παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα μικρών πυκνών LDL σωματιδίων (small dense LDL) και υψηλά επίπεδα οξειδωμένης LDL χοληστερόλης (17,18). Εκτός των παραπάνω, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται και στα υποκλάσματα της HDL. Σε μία μελέτη σε μικρό αριθμό ασθενών με NAFLD αναδείχθηκε πως το λιπώδες ήπαρ σχετίζεται στατιστικά σημαντικά και ανεξάρτητα με χαμηλότερα επίπεδα της HDL2 χοληστερόλης, που είναι πιθανά πιο αντιαθηρογόνος (19). Τα παραπάνω εξηγούν εν μέρει τον υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο που παρουσιάζουν οι ασθενείς με NAFLD αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτές τις διαφορές δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί.

#### *1.3.5 Φύλο και ηλικία*

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αντικρουόμενες μελέτες για το ρόλο του φύλου στην ανάπτυξη της NAFLD (1). Τελευταία, επιδημιολογικές ανασκοπήσεις αλλά και οι κατευθυντήριες οδηγίες της ASSLD αναφέρουν πως το άρρεν φύλο θεωρείται παράγοντας κινδύνου και ο επιπολασμός της νόσου είναι 2 φορές μεγαλύτερος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες (11). Ειδικότερα, παρατηρείται αυξημένος επιπολασμός σε νεαρούς και μέσης ηλικίας άρρενες, ενώ η συχνότητα της νόσου μειώνεται μετά την ηλικία των 50-60 ετών. Αντίθετα, στις γυναίκες αυξημένη επίπτωση της νόσου παρατηρείται μετά την ηλικία των 50 ετών με επιπλέον πιο προχωρημένη ιστολογική εικόνα NASH από ότι οι άντρες (20). Γενικά, θεωρείται πως ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται με την ηλικία αλλά και πως όσο αυξάνεται η ηλικία τόσο πιο προχωρημένο είναι και το στάδιο της ηπατικής νόσου (20). Αξίζει να αναφέρει πως το λιπώδες ήπαρ παρουσιάζεται και σε παιδιατρικό πληθυσμό και θεωρείται η πιο κοινή ηπατική παθολογική κατάσταση που συναντάται σε παιδιά ηλικίας 2-19 ετών . Η πλειοψηφία των παιδιών αυτών, όπως και οι ενήλικες, παρουσιάζουν αυξημένο BMI (21).

### 1.3.6 Δίαιτα και εντερικό μικροβίωμα

Η δίαιτα θεωρείται ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου. Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν πως συχνά ασθενείς με NAFLD έχουν μία δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και αυτή θεωρείται υπεύθυνη για την εξέλιξη σε NASH. Μάλιστα το είδος του διαιτητικού λίπους που προσλαμβάνουν οι ασθενείς παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεση της νόσου, μιας και τα πολυακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν αναδειχθεί ευεργετικά (22). Επιπλέον, η δίαιτα πλούσια σε υδατάνθρακες είναι ικανή να επιδεινώσει την κλινική εικόνα των ασθενών (23). Το ενδιαφέρον των μελετητών έχει πλέον στραφεί στην αυξημένη πρόσληψη φρουκτόζης η οποία φαίνεται πως σχετίζεται με τις επιπλοκές της αντίστασης στην ινσουλίνη και οδηγεί σε μεταβολικό σύνδρομο (24). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η διατροφή δυτικού τύπου, που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, επεξεργασμένων δημητριακών, γλυκών και αναψυκτικών με γλυκαντικές ουσίες, σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα ή κίνδυνο για τη εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου. Αντίθετα, η δίαιτα πλούσια σε ολικής αλέσεως δημητριακά, φρούτα, λαχανικά και ψάρια, όπως η Μεσογειακή Διατροφή, φαίνεται να έχει ευεργετικά αποτελέσματα και μάλιστα μέχρι σήμερα θεωρείται από την πιο αποτελεσματική και κοινά αποδεκτή υγειονομιακή παρέμβαση στη NAFLD (25).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών κάνει πλέον λόγο για ένα εντερικό μικροβίωμα, μια παράμετρο που ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο όρος εντερικό μικροβίωμα περιγράφει το σύνολο του γενομικού και μεταβολικού περιεχομένου της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας (microbiota) και ως δυσβίωση ορίζεται η διαταραχή στην ισορροπία αυτής της χλωρίδας (26). Διαφορετικές δίαιτες έχουν συσχετιστεί με διαφορετικό μικροβίωμα. Η δίαιτα πλούσια σε λαχανικά σχετίζεται με την ανεύρεση των *Bacteroides*, ιδιαίτερα της *Provetella* και η Μεσογειακή διατροφή σχετίζεται με την ανεύρεση μικροβίων του είδους *Enterobacteriaceae*, ιδιαίτερα *Shigella* και *Escherichia*. Αλλαγές στη διατροφή μπορούν να οδηγήσουν σε ανιχνεύσιμες διαφορές στο μικροβίωμα αλλά όχι σε τελείως διαφορετικό εντερότυπο. Στην περίπτωση της παχυσαρκίας, η εξέταση του μικροβιώματος ανέδειξε μεγαλύτερο αριθμό *Firmicutes* από ότι *Bacteroides* και γενικά παρουσιάζει μικρότερη ποικιλία, εάν συγκριθεί με το μικροβίωμα ατόμων με φυσιολογικό BMI (26). Όσον αφορά τη NAFLD, η ικανότητα του εντερικού μικροβιώματος να προξενεί τη νόσο έχει αναγνωριστεί πριν από 20 χρόνια λόγω της εμφάνισής της σε ασθενείς με βακτηριακή υπερανάπτυξη λεπτού εντέρου. Ακόμα και αν ο ακριβής εντερότυπος των ασθενών με NAFLD βρίσκεται υπό διερεύνηση, έχει πλέον σαφώς διευκρινιστεί πως είναι διαφορετικός από αυτόν των υγιών ατόμων(27). Η δυσβίωση μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεια της νόσου μέσω δυσλειτουργίας του εντερικού επιθηλίου. Αυτή η διαταραχή στον εντερικό φραγμό επιτρέπει την είσοδο των βακτηρίων και των

προϊόντων τους, όπως η ενδοτοξίνη ή η αιθανόλη στην πυλαία κυκλοφορία, ενεργοποιώντας τη φλεγμονή στο ηπατικό παρέγχυμα (14). Πιο λεπτομερής περιγραφή του παθογενετικού μηχανισμού γίνεται στην επόμενη ενότητα. (βλ. Παθοφυσιολογία-Παθογένεια)

### 1.3.7 Τρόπος ζωής και κάπνισμα

---

Το κάπνισμα έχει αναγνωριστεί ως ένας επιπλέον ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της NAFLD σύμφωνα με μία αναδρομική μελέτη με δείγμα 2029 συμμετέχοντες (28). Μία πιθανή εξήγηση για το παραπάνω εύρημα είναι ότι η χρήση καπνού φαίνεται να προδιαθέτει στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη. Σε ότι αφορά τον τρόπο ζωής, ο κίνδυνος εμφάνισης της NAFLD και της NASH έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη φυσική κατάσταση ενός ατόμου και συγκεκριμένα με την καθιστική ζωή (20). Μάλιστα, η φυσική άσκηση αποτελεί μέρος των υγιεινοδιαιτητικών παρεμβάσεων για την αντιμετώπιση της νόσου, καθώς έχει αναγνωριστεί ως ευεργετική στη λιπώδη διήθηση του ήπατος (29).

### 1.3.8 Άλλες παθήσεις

---

Τα τελευταία χρόνια το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovarian syndrome: POCS) και το σύνδρομο Αποφρακτικής Άπνοιας Ύπνου (obstructive sleep apnea: OSA) αναφέρονται ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου. Το POCS, μία κοινή ενδοκρινική διαταραχή σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη και πιθανά αυτά τα χαρακτηριστικά είναι και υπεύθυνα για τον αυξημένο επιπολασμό της NAFLD σε αυτόν τον πληθυσμό γυναικών. Το σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας ύπνου συγκεκριμένα φαίνεται να είναι κυρίως υπεύθυνο για την εξέλιξη της NAFLD από απλή στεάτωση σε NASH (20).

## 1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

---

Η γεωγραφική κατανομή, ο αυξημένος επιπολασμός της νόσου σε οικογένειες αλλά και μελέτες σε δίδυμους οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η εμφάνιση της NAFLD σχετίζεται και με γενετικούς παράγοντες. Επιπλέον παραμένει αδιευκρίνιστο για ποιο λόγο μόνο ένας μικρός αριθμός ασθενών με NAFLD θα παρουσιάσουν τελικά τα πιο προχωρημένα στάδια της νόσου συμπεριλαμβανομένου του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Συνεπώς, η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος θεωρείται μία πολυπαραγοντική νόσος, όπου γενετικοί και περιβαλλοντικοί

παράγοντες αλληλοεπιδρούν και οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου ή καθορίζουν την εξέλιξη της. Με τη βοήθεια των “μελετών σύνδεσης ολόκληρου του γονιδιώματος” (“genome-wide association study”) έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένα γονίδια σε μεγάλο αριθμό ασθενών με NAFLD. Από το σύνολο των γενετικών συσχετίσεων στη βιβλιογραφία, δύο είναι αυτές που αξίζουν προσοχής λόγω της συσχέτισης τους με τη βαρύτητα της νόσου αλλά και λόγω της επισήμανσής τους σε πολλές διαφορετικές μελέτες.

Η πρώτη αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί την Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 ή PNPLA3 και πρόκειται για πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP). Η SNP του PNPLA3 γονιδίου είναι μία μη συνώνυμη μετάλλαξη αντικατάστασης της κυτοσίνης σε γουανίνη, η οποία οδηγεί σε αλλαγή της ισολευκίνης σε μεθειονίνη στο κωδικόνιο 148. Έχει παρατηρηθεί πως η παρουσία του αλληλόμορφου γονιδίου PNPLA3<sup>148M</sup> σχετίζεται με αυξανόμενη HTGC (Hepatic Triglyceride Context) που προσδιορίζεται με <sup>1</sup>H-MRS (30). Η συχνότητα του αλληλόμορφου εξηγεί από πολλές μελέτες και τις διαφορές στον επιπολασμό της NAFLD ανάμεσα σε διαφορετικές εθνικότητες. Επιπλέον, ο PNPLA3 πολυμορφισμός σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου και πιο πρόσφατα με την παρουσία HCC (31). Για τους παραπάνω λόγους, ο πολυμορφισμός προτείνεται να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τον κίνδυνο εμφάνισης βαρύτερης μορφής της νόσου αλλά και ως μέρος της στρατηγικής επιτήρησης του HCC. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η παραπάνω μετάλλαξη συνεισφέρει στην παθογένεια της νόσου παραμένει υπό διερεύνηση, ωστόσο η πρωτεΐνη PNPLA3 ή αδιπονετρίνη είναι μία λιπάση των τριγλυκεριδίων που ρυθμίζει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων στα λιποκύτταρα. Πιστεύεται ότι ο παραπάνω πολυμορφισμός οδηγεί σε αλλαγές στην αρχιτεκτονική του λιπώδους ιστού και μεταβολές στον μεταβολισμό της ρετινόλης στα κύτταρα Kupffer (32).

Η δεύτερη αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί την TM6SF2. Πρόκειται και σε αυτή την περίπτωση για μία μη συνώνυμη SNP η οποία σχετίζεται και αυτή με αυξημένες τιμές HTGC στην <sup>1</sup>H-MRS και με την εξέλιξη της νόσου (33). Η TM6SF2 φαίνεται πως ρυθμίζει την αντίστροφη μεταφορά λιπιδίων στο ήπαρ, και η απουσία της ή η μετάλλαξη της πρωτεΐνης αυτής οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή VLDL, TG και APOB, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων και τη λιπώδη διήθηση του ήπατος (34).

## 1.5 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Οι αρχικές θεωρίες για την παθογένεια της NAFLD ήταν βασισμένες στη θεωρία των 2 βημάτων “2-hit hypothesis”. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, το πρώτο βήμα αφορά τη συσσώρευση

τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας του ήπατος στη βλάβη. Η ηπατοκυτταρική βλάβη, που αποτελεί το 2ο βήμα της υπόθεσης, μεσολαβείται από φλεγμονώδεις παράγοντες όπως κυτοκίνες και αδιποκίνες, από την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό stress. Τελικά, η ηπατοκυτταρική βλάβη θα οδηγήσει σε στεατοηπατίτιδα ή/και σε ίνωση (35). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η παραπάνω υπόθεση έχει τροποποιηθεί, διότι αναγνωρίστηκε πως τα ίδια τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) είναι ικανά να οδηγήσουν σε ηπατοκυτταρική βλάβη. Στην περίπτωση της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη παρατηρείται αυξημένη μεταφορά των FFA στο ήπαρ, εκεί τα FFA είτε υφίστανται β-οξείδωση είτε εστεροποιούνται με γλυκερόλη, για να σχηματίσουν τα τριγλυκερίδια, με τελικό αποτέλεσμα τη λιπώδη διήθηση του ήπατος. Αυτά τα FFA προκαλούν ηπατοτοξικότητα, χωρίς την επίδραση του 2ου βήματος, αλλά μέσω αύξησης του οξειδωτικού stress και μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών της φλεγμονής (35). Επιπλέον, για να διευκρινιστεί η εξέλιξη της NASH σε ίνωση ήταν απαραίτητο να αναγνωριστεί κάποιος παθογενετικός μηχανισμός που οδηγεί σε διαταραχή του φυσιολογικού πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων. Έτσι, προτάθηκε το 3ο βήμα. Στο φυσιολογικό ήπαρ, ο κυτταρικός θάνατος ενεργοποιεί το σχηματισμό ώριμων ηπατοκυττάρων, τα οποία αντικαθιστούν τα νεκρά κύτταρα και σχηματίζουν φυσιολογικό λειτουργικό ιστό. Στην περίπτωση της NAFLD, το οξειδωτικό stress αναστέλλει το σχηματισμό ώριμων κυττάρων, με αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού των προγονικών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα, στη συνέχεια, διαφοροποιούνται στα ενδιάμεσα hepatocyte-like κύτταρα. Η αδυναμία των ηπατοκυττάρων, μετά την απόπτωσή τους, να ενεργοποιήσουν τη φυσιολογική ωρίμανση των πρόδρομων ηπατοκυττάρων σε φυσιολογικά και λειτουργικά ηπατοκύτταρα, πιστεύεται ότι αποτελεί το τρίτο βήμα (hit) και φαίνεται να καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τόσο την εμφάνιση αλλά και το στάδιο της ίνωσης/κίρρωσης (36).

### 1.5.1 Στεάτωση

Η NAFLD, όπως αναφέρθηκε οφείλεται στη συσσώρευση τριγλυκεριδίων, τα οποία σχηματίζονται από την εστεροποίηση των FFA με τη γλυκερόλη εντός των ηπατοκυττάρων. Η αύξηση των FFA μπορεί να προέρχεται από τρεις διαφορετικές πηγές. Α) Λιπόλυση (60%) Β) de novo lipogenesis (DNL) (26%) Γ) Διατροφή. (15%) (37).

Α) Λιπόλυση: Η ινσουλίνη προάγει την επανεστεροποίηση των FFA σε τριγλυκερίδια και αναστέλλει την λιπόλυση στο λιπώδη ιστό. Σε καταστάσεις όμως αντίστασης στην ινσουλίνη, παρά την υπερινσουλιναμία, η αναστολή της λιπόλυσης είναι μειωμένη, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των FFA. Στην περίπτωση της παχυσαρκίας η αντίσταση στην ινσουλίνη οφείλεται στην αξιοσημείωτη αύξηση του λιπώδους ιστού. Αυτή με τη σειρά της οδηγεί σε δυσλειτουργία του έκτοπα

αποθηκευμένου λίπους και απελευθέρωση κυτοκινών από τα λιποκύτταρα που προάγουν την αντίσταση στην ινσουλίνη (38). Τα FFA της κυκλοφορίας προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω των μεταφορέων FAT5 και CD36, που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στην παχυσαρκία. Τέλος, στα ηπατοκύτταρα γίνεται η σύνθεση των τριγλυκεριδίων και κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η διακυλογλυκερόλη (DAG) εμποδίζει επιπλέον τη σηματοδότηση της ινσουλίνης μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης Cε PKCε (39).

B) De novo lipogenesis : DNL ορίζεται ως η διαδικασία κατά την οποία το ίδιο το ήπαρ παράγει λιπίδια από υδατάνθρακες και θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη της NAFLD. Η υπερινσουλιναιμία σχετιζόμενη με IR οδηγεί σε αύξηση δραστηριότητας των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη DNL. Αυτό πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης δύο μεταγραφικών παραγόντων, της sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) και της carbohydrate response element binding protein (ChREBP) (37). Η υπερκατανάλωση φρουκτόζης συγκεκριμένα οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της DNL.

Γ) Διατροφή: Τα σάκχαρα που προέρχονται από τη διατροφή μετατρέπονται μέσω DNL σε FFA και τα λιπίδια της διατροφής προσλαμβάνονται από το ήπαρ παράλληλα με τα FFA του λιπώδους ιστού.

### 1.5.2 Μηχανισμοί που οδηγούν στο κυτταρικό θάνατο των ηπατοκυττάρων

Στα πλαίσια της NAFLD τα ηπατοκύτταρα μπορούν να υποστούν βλάβη με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός οφείλεται στην αυξημένη ανάγκη μεταβολισμού της περίσσειας των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η παραπάνω μεταβολική απαίτηση επιβαρύνει σημαντικά τα μιτοχόνδρια, οδηγεί στη δυσλειτουργία τους και τελικά στην αύξηση παραγωγής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS: reactive oxygen species) και στην ενεργοποίηση της JNK κινάσης. Τα παραπάνω έχουν ως συνέπεια την μιτοχονδριακή βλάβη, τη διαταραχή παραγωγής ATP και τελικά τον κυτταρικό θάνατο (37). Επιπλέον, τα ίδια τα FFA οδηγούν άμεσα σε ηπατοκυτταρική βλάβη μέσω αύξησης του stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων ( ERS: endoplasmic reticulum stress), που με τη σειρά του οδηγεί σε μιτοχονδριακή βλάβη και κυτταρικό θάνατο μέσω της caspase-2-mediated cleavage της BH3-only protein BID (39). Τέλος, έχει προταθεί πως τα FFA ενεργοποιούν υποδοχείς υπεύθυνους για την απόπτωση (death receptors) όπως FAS, DR5 και TNFR1 (39).

### 1.5.3 Φλεγμονή/Στεατοηπατίτις

Η στεατώση είναι στενά συνδεδεμένη με τη χρόνια φλεγμονή του ήπατος, η οποία θα οδηγήσει με τη συνύπαρξη και άλλων παραγόντων τελικά στην εκδήλωση της NASH και στην ίνωση. Η χρόνια φλεγμονή εν μέρει μεσολαβείται από την ενεργοποίηση του Ikk-b/NF-kB σηματοδοτικού μονοπατιού.



Τα κύρια κύτταρα υπεύθυνα για τη φλεγμονή είναι τα Kupffer cells, τα μακροφάγα και τα NKT κύτταρα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως διαφορετικά μόρια ή ουσίες είναι ικανές να πυροδοτήσουν τη φλεγμονή στο λιπώδες ήπαρ (39). Τα FFA, η βακτηριακή ενδοτοξίνη και τα μοριακά υπολείμματα DAMPs από νεκρωμένα ηπατοκύτταρα πυροδοτούν τη φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης Toll-like υποδοχέων σε στοχευμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού, με αποτέλεσμα την παραγωγή διαμεσολαβητών φλεγμονής (39). Η φρουκτόζη θεωρείται προφλεγμονώδης παράγοντας καθώς είναι δυνατό να οδηγήσει στην εξέλιξη της NASH μέσω αύξησης της έκφρασης γονιδίων φλεγμονής των ηπατοκυττάρων αλλά και μέσω μείωση της μιτοχονδριακής β-οξειδωσης και των επιπέδων ATP (40). Οι διαταραχές στο μεταβολισμό του σιδήρου ενοχοποιούνται για την έναρξη της φλεγμονής στην περίπτωση του λιπώδους ήπατος, κυρίως μέσω αύξησης του ενδοκυττάρου σιδήρου, την ενεργοποίηση φλεγμονωδών διεργασιών και του οξειδωτικού στρες. Τα χαμηλά επίπεδα του χαλκού πέρα από μεταβολές στο λιπιδαιμικό προφίλ που μπορούν να προκαλέσουν πιστεύεται ότι πυροδοτούν τη φλεγμονή μέσω δυσλειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (41).

#### *1.5.4 Ο ρόλος των λιπιδίων στη φλεγμονή*

Η ελεύθερη χοληστερόλη πυροδοτεί τη φλεγμονή μέσω συσσώρευσής της στα μη- παρεγχυματικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, εκεί η χοληστερόλη επηρεάζει τη διαπερατότητα της μεμβράνης, επιτρέπει την απώλεια της γλουταθειόνης από τα μιτοχόνδρια, με τελικές συνέπειες το οξειδωτικό στρες, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την απόπτωση. Επιπλέον, οι κρύσταλλοι χοληστερόλης που ανευρίσκονται στη λιπιδιακή μεμβράνη των ηπατοκυττάρων, είναι δυνατό να προκαλέσουν ενεργοποίηση των Kupffer κυττάρων και των μακροφάγων. Οι κρύσταλλοι χοληστερόλης ενεργοποιούν επίσης το NLRP3 φλεγμονόσωμα και τη protease caspase 1 στα παραπάνω κύτταρα οδηγώντας σε παραγωγή IL-1β και TNF (41). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα ενοχοποιούνται για την εκδήλωση της NASH μέσω αύξησης της DNL και έχουν συσχετιστεί με την αυξημένη έκφραση των UPR (unfolded protein response)- σχετιζόμενων μορίων που οδηγούν σε ERS και σε απόπτωση (42). Γενικά, οι βιοδραστικοί διαμεσολαβητές προερχόμενοι από ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα πιστεύεται ότι έχουν προφλεγμονώδη επίδραση (όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια και υδροξυεικοσατετραενοικά οξέα). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως τα φωσφολιπίδια των ηπατικών μεμβρανών των ασθενών με NAFLD περιέχουν περισσότερα ω-6 παρά ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να αποτελούν στόχους για φωσφολιπάσες. Συγκεκριμένα το παλμιτικό (C16:0) και το στεατικό οξύ (C18:0) που είναι SFA, είναι άμεσα τοξικά για το κύτταρα. Είναι ικανά να οδηγήσουν σε ηπατοκυτταρική απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της JUN N-terminal kinase (JNK)

και μιτοχονδριακών μονοπατιών απόπτωσης αλλά και μέσω ERS και ενεργοποίησης της φλεγμονής (42).

#### *1.5.5 Ο ρόλος του λιπώδους ιστού στη φλεγμονή- Αδιποκίνες*

Ο λιπώδης ιστός συμμετέχει στη φλεγμονή με πολλούς μηχανισμούς. Πέρα από την επίδρασή του στην αντίσταση στην ινσουλίνη, το σπλαχνικό λίπος (VAT:visceral adipose tissue) συγκεκριμένα σχετίζεται με τη φλεγμονή και την ίνωση στη NAFLD, καθώς απελευθερώνει χυμοκίνες και κυτοκίνες όπως την C-C motif chemokine 2 (CCL2) και TNF. Έχει προταθεί πως η δυσλειτουργία του VAT προσελκύει μακροφάγα. Στη συνέχεια τα μακροφάγα περιβάλλουν τα νεκρά λιποκύτταρα, σχηματίζοντας δομές που μοιάζουν με στέμμα και συσχετίζονται με την ηπατοκυτταρική βλάβη και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, TNF και IL-1β) (43). Ο λιπώδης ιστός θεωρείται το μεγαλύτερο ενδοκρινές όργανο, διότι παράγει και εκκρίνει ορμόνες, κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και εξωκυττάρια πρωτεΐνες. Τα παραπάνω περιγράφονται συνολικά με τον όρο αδιποκίνες. Πιο καλά μελετημένες στη βιβλιογραφία είναι η αδιπονεκτίνη και η λεπτίνη και έχει παρατηρηθεί πως στους ασθενείς με NAFLD παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα λεπτίνης και χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης. Συγκεκριμένα η λεπτίνη θεωρείται πως συμμετέχει στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, προάγοντας τη φλεγμονή και την ίνωση. Αντίθετα, η αδιπονεκτίνη πιστεύεται πως έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και πως είναι ικανή να αυξήσει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (44).

#### *1.5.6 Ο ρόλος του εντερικού μικροβιώματος στη χρόνια φλεγμονή*

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο μηχανισμός με τον οποίο η NASH σχετίζεται με την δυσβίωση σχετίζεται με διαταραχή του εντερικού φραγμού και αύξηση της ενδοτοξίνης. Η ενδοτοξίνη μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονώδη απάντηση μέσω ενεργοποίησης των ηπατικών φλεγμονωδών κυττάρων. Οι περισσότερες μελέτες για την εξακρίβωση του μηχανισμού αφορούν ποντίκια και ακόμα τα αποτελέσματά τους δεν είναι πλήρως κατανοητά. Αυτό που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με NASH είναι η μειωμένη έκφραση της JAMA πρωτεΐνης στο βλεννογόνο του εντέρου και αυξημένη φλεγμονή του βλεννογόνου. Η μείωση αυτή πιθανά οδηγεί σε αύξηση της βατότητας του εντερικού φραγμού και μικροβιακή μετατόπιση (41). Επιπλέον, οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν χαμηλό αριθμό CD4 και CD8 T λεμφοκυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο, στοιχεία που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα εντερικών κυτταροκινών και διαταραχή των μεσοκυτταρικών συνδέσεων (41).

## 1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΗΠΑΤΟΣ

Η διάγνωση της νόσου γίνεται με βάση ένα συνδυασμό κλινικών παραγόντων και απεικόνισης του ήπατος. Οι περισσότεροι ασθενείς με NAFLD είναι ασυμπτωματικοί ή παρουσιάζουν μη ειδικά συμπτώματα, όπως ζάλη, διαταραχή του ύπνου και ήπια ενόχληση στο δεξιό υποχόνδριο. Δυστυχώς, όταν οι ασθενείς παρουσιάσουν ειδικά συμπτώματα, τότε η νόσος έχει ήδη εξελιχθεί σε βαρύτερης μορφής και τα συμπτώματα οφείλονται στην πυλαία υπέρταση. Ορισμένες φορές η νόσος ανιχνεύεται λόγω αυξημένων τιμών τρανσαμινασών (AST, ALT), ωστόσο τα ηπατικά ένζυμα δεν αποτελούν διαγνωστικά κριτήρια μιας και το 60% των ασθενών με NAFLD μπορεί να παρουσιάζουν φυσιολογικές τιμές ALT παρά το ότι έχουν NASH ή προχωρημένη ίνωση (45). Επιπλέον, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών διαγιγνώσκεται με NAFLD μετά από ανεύρεση λιπώδους διήθησης ήπατος σε τυχαίο απεικονιστικό έλεγχο. Λόγω απουσίας κάποιου ειδικού και ευαίσθητου βιοδείκτη για τη νόσο, η διάγνωση της NAFLD απαιτεί τον αποκλεισμό όλων των άλλων χρόνιων ηπατικών νόσων και των δευτεροπαθών αιτιών της λιπώδους διήθησης όπως είναι τα φάρμακα. Οι ηπατοπάθειες που είναι απαραίτητο να αποκλειστούν είναι οι: ηπατοπάθεια οφειλόμενη σε αυξημένη χρόνια κατανάλωση αλκοόλ (>20g /ημέρα για τους άνδρες ή >10g/ ημέρα για τις γυναίκες,) οι ιογενείς ηπατίτιδες HBV/HCV, η αυτοάνοση ηπατίτιδα, η νόσος Wilson, η αιμοχρωμάτωση, και η στεάτωση οφειλόμενη σε φάρμακα ( κορτικοστεροειδή, αμιωδαρόνη, μεθοτρεξάτη, ταμοξιφαίνη) (46).

### *Απεικόνιση*

Το υπερηχογράφημα ήπατος είναι μία ευρέως διαθέσιμη μη επεμβατική εξέταση που χρησιμοποιείται σήμερα για την ανίχνευση της νόσου στην κλινική πράξη. Ωστόσο, η εξέταση παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία διότι δύναται να ανιχνεύσει τη λιπώδη διήθηση μόνο όταν η στεάτωση είναι παρούσα σε ποσοστό άνω 20-30% των ηπατοκυττάρων (47). Επιπλέον, δεν είναι δυνατή η αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της στεάτωσης που είναι απαραίτητη για την παρακολούθηση των ασθενών ειδικότερα μετά από παρεμβάσεις. Η *in vivo* Φασματογραφία Μαγνητικού Συντονισμού (In vivo Magnetic resonance spectroscopy) είναι μία σημαντικά ευαίσθητη και ποσοτική απεικονιστική μέθοδος αλλά είναι υψηλού κόστους και όχι ευρέως διαθέσιμη. Τέλος, η βιοψία ήπατος παραμένει ακόμα και σήμερα η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τη διάγνωση και την παρακολούθηση των ιστολογικών αλλαγών της NAFLD. Ωστόσο, αποτελεί μία επεμβατική μέθοδο με κίνδυνο επιπλοκών, η οποία δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση (screening) και την παρακολούθηση της εξέλιξης.

## 1.7 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ NAFLD - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

---

Ο στόχος της ιστολογικής εξέτασης ενός παρασκευάσματος από βιοψία ήπατος είναι πέρα από να τεθεί η διάγνωση, είναι να γίνει σταδιοποίηση της νόσου και του βαθμού φλεγμονής. Από το NASH CRN (Clinical Research Network) έχουν προταθεί οι εξής διαγνωστικές κατηγορίες :

(1) Χωρίς εικόνα NAFLD ( <5% στεάτωση, εξ' ορισμού)

(2) NAFLD, αλλά όχι NASH (> ή ίση 5% στεάτωση, παρουσία ή απουσία λοβιακής και πυλαίας φλεγμονής )

(3) Οριακή στεατοηπατίτιδα ζώνης 1 ή ζώνης 3 (παρουσία των περισσότερων αλλά όχι όλων των κριτηρίων διάγνωσης της στεατοηπατίτιδας, με έμφαση στη φλεγμονή η βλάβη στη ζώνη 1 ή ζώνη 3 αντίστοιχα)

(4) Σαφή στεατοηπατίτιδα (παρουσία όλων των κριτηρίων διάγνωσης, όπως στεάτωση, ηπατοκυτταρική διόγκωση και λοβιακή φλεγμονή (46).

Οι παραπάνω κατηγορίες συμπεριλαμβανομένης και της 1ης μπορούν να παρουσιάζουν οποιοδήποτε στάδιο ίνωσης μέχρι την εικόνα κίρρωσης. Έτσι, η σταδιοποίηση γίνεται ως εξής :

Στάδιο 1 είναι η ζώνης 3 (πέριξ των φλεβιδίων), περιτριχοειδική ή περιπυλαία ίνωση.

Στάδιο 2 είναι παρουσία ίνωσης στη ζώνη 3 αλλά και περιπυλαία.

Στάδιο 3 ίνωση που εκτείνεται από πυλαία περιοχή σε κεντρικότερες.

Στάδιο 4: κίρρωση (46).

## 2 ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ NAFLD

---

Ο συνεχώς αυξανόμενος επιπολασμός της νόσου αλλά και ο κίνδυνος εξέλιξης σε ίνωση και κίρρωση οδήγησε στην ανάγκη ανεύρεσης νεότερων βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες αυτοί είτε χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της απλής στεάτωσης είτε για την ανίχνευση της NASH και ίνωσης.

### 2.1 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ NAFLD

---

Βιοδείκτες στον ορό του αίματος: Οι παθολογικές τιμές της ηπατικής βιοχημείας δεν είναι ειδικοί βιοδείκτες της νόσου, αλλά οι υψηλές τιμές της AST και ALT είναι ενδεικτικές μη ειδικής ηπατοκυτταρικής βλάβης. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι ασθενείς με επιβεβαιωμένη νόσο μπορούν να παρουσιάζουν φυσιολογικές τιμές τρανσαμινασών σε ποσοστό 60-80%. Ωστόσο, όταν ανευρίσκονται αυξημένες, η ALT είναι συνήθως υψηλότερη από την AST και μπορεί να είναι 2 έως 4 φορές πάνω από το φυσιολογικό όριο. Επιπλέον, η  $\gamma$ -GT και η ALP μπορεί να είναι 1,5 μέχρι 3 φορές άνω του φυσιολογικού. Οι αυξημένες τιμές σχετίζονται με την εμφάνιση της NASH αλλά όχι με το στάδιο της ίνωσης (48).

Οι βιοδείκτες που φαίνεται να είναι περισσότερο αξιόπιστοι για την πρόβλεψη της απλής στεάτωσης είναι το Fatty Liver Test (FLI test) (ευαισθησία 87%), το Steatotest (ευαισθησία 85%) και το NAFLD liver fat score (ευαισθησία 71%). Εάν και το screening για τη νόσο δεν προτείνεται από τις κατευθυντήριες οδηγίες οι παραπάνω βιοδείκτες χρησιμοποιούνται σε μεγάλης κλίμακας μελέτες-screening. Άλλοι βιοδείκτες που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία αλλά δεν έχουν πλήρως αξιολογηθεί είναι TyG (triglyceride to glucose index), HSI (hepatic steatosis index) και VAI (visceral adiposity index) (49).

### 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ NASH.

---

Πρόσφατα, για τη μη επεμβατική σταδιοποίηση της στεάτωσης έχει προταθεί η μέτρηση της παραμέτρου CAP (controlled attenuation parameter), χρησιμοποιώντας την ελαστογραφία ήπατος (Transient elastography). Η παράμετρος CAP μετρά το βαθμό US εξασθένησης εντός του ηπατικού λίπους. Από διάφορες μελέτες η παραπάνω μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει τη στεάτωση αλλά παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία σε παχύσαρκους ασθενείς και δεν παύει να εξαρτάται και από τον

χειριστή που πραγματοποιεί τη μέτρηση. Παρά τα μειονεκτήματα της μεθόδου παραμένει η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον έλεγχο της στεάτωσης στην κλινική πράξη (50).

**Δείκτες απόπτωσης:** Ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης στη βιβλιογραφία φαίνεται να είναι η cytokeratin 18 (CK18). Κατά την ενεργοποίηση μονοπατιών της απόπτωσης, ενεργοποιείται η caspase 3, η οποία αποκόπτει διάφορα ενδοκυττάρια στοιχεία συμπεριλαμβανομένου και της CK18. Τα μικρά θραύσματα της πρωτεΐνης μπορούν να μετρηθούν στον ορό χρησιμοποιώντας ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα και έχει παρατηρηθεί πως τα επίπεδα είναι σημαντικά υψηλότερα στη NASH από ότι στη NAFLD. Ο παραπάνω βιοδείκτης δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος και δεν έχει ακόμα προταθεί ποιο πρέπει να είναι το κατώφλι “cut off” , για να είναι δυνατή η χρήση του στην κλινική πράξη. Άλλοι δείκτες κυτταρικής απόπτωσης που έχουν προταθεί ως βιοδείκτες ήταν η uncleaved CK18, το διαλυτό Fas και σύμπλοκο Fas, χωρίς όμως να υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την ευαισθησία τους (51).

**Βιοδείκτες φλεγμονής και οξειδωτικούς stress:** Η φλεγμονή, όπως αναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου και ειδικότερα στην εξέλιξη της NAFL σε στεατοηπατίτιδα. Ως βιοδείκτες έχουν προταθεί οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και η ιντερλευκίνη IL-6 και άλλες κυτταροκίνες IL-1β και φλεγμονώδεις πρωτεΐνες των μακροφάγων. Αν και έχουν βρεθεί σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των παραπάνω πρωτεϊνών ανάμεσα σε ασθενείς με NASH και σε ασθενείς με απλή στεάτωση, οι διαφορές δεν είναι τόσες μεγάλες, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι βιοδείκτες. (50) Επιπλέον, το ενδιαφέρον των μελετητών στρέφεται στη χρήση των αδιποκινών ως βιοδεικτών. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν την αδιπονεκτίνη και τη λεπτίνη, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου και σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τις μελέτες παραμένουν αντικρουόμενα. (50)

Επιπλέον το οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στη νόσο έχει γίνει αντικείμενο μελέτης για την ανεύρεση βιοδεικτών. Για την εκτίμηση του οξειδωτικού stress μελετήθηκε η έκφραση της CYP2E1, ενός ενζύμου του κυτοχρώματος P450 με προ-οξειδωτική λειτουργία. Παρόλο που η έκφραση δεν φαίνεται να διαφέρει στους ασθενείς με NASH, πιστεύεται ότι η δραστηριότητα του παραπάνω ενζύμου σχετίζεται με την υπερπαραγωγή οξειδωτικών ριζών και τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Επιπλέον, σε μία σειρά μελετών με βάση την υπεροξείδωση των λιπιδίων έχει αναγνωριστεί πως η oxLDL, παράγωγα της οξείδωσης του λινολεϊκού οξέος (9- and 13-HODEs and 9- and 13-oxoODEs) και ουσίες προερχόμενες από θειοβαρβιτουρικό οξύ είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με NASH σε σχέση με ασθενείς με απλή στεάτωση. Η χρήση των παραπάνω ευρημάτων έχει προταθεί σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους για τον υπολογισμό της πιθανότητας εμφάνισης της NASH. (52,53)

**Προγνωστικά μοντέλα της NASH:** Στη βιβλιογραφία προτείνονται προγνωστικά μοντέλα που χρησιμοποιούν έναν συνδυασμό κλινικών, εργαστηριακών ευρημάτων και βιοδεικτών, για να

προβλέψουν την παρουσία της NASH. Τέτοια είναι το HAIR score και το NASH predictive index (NPI). Η ακρίβεια των παραπάνω μοντέλων είναι πολλά υποσχόμενη αλλά μέχρι τώρα δεν υπάρχει εξωτερική επαλήθευση (external validation) (51).

### 2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

Οι βιοδείκτες που προτείνονται για την ίνωση φαίνεται να έχουν πολύ καλύτερη απόδοση. Πρόκειται και σε αυτή την περίπτωση κυρίως για προγνωστικά μοντέλα που χρησιμοποιούν εργαστηριακά κυρίως ευρήματα και βιοδείκτες. Τα διαθέσιμα στη βιβλιογραφία είναι το NAFLD Fibrosis score (NFS), το FIB4 και τα εμπορικά διαθέσιμα FibroTest, FibroMeter και το ELF test (Enhanced Liver Fibrosis test). Όλα τα παραπάνω εργαλεία παρουσιάζουν αποδεκτή διαγνωστική ακρίβεια, αλλά μόνο το NFS και το FIB-4 έχουν αξιολογηθεί και επαληθευθεί εξωτερικά. Αξίζει να σημειωθεί πως τα παραπάνω εργαλεία έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια στον αποκλεισμό της ίνωσης, αλλά είναι λιγότερο ακριβή στον καθορισμό της λιγότερο σοβαρής ίνωσης του ήπατος (50).

Τέλος, η σταδιοποίηση της ίνωσης μπορεί να γίνει με τη βοήθεια απεικονιστικών εργαλείων. Η ελαστογραφία ήπατος (Vibration controlled transient elastography) χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της προχωρημένης ίνωσης στους ασθενείς με NAFLD, αλλά φαίνεται να μειονεκτεί στη διάγνωση της πρώιμης ίνωσης. Η μέθοδος ARFI (acoustic radiation force impulse), που χρησιμοποιεί παρόμοια μεθοδολογία αλλά με τη βοήθεια του απλού υπερήχου, παρουσιάζει την ίδια διαγνωστική απόδοση με τη VCTE. Η ελαστογραφία βασισμένη στον μαγνητικό συντονισμό (Magnetic resonance elastography: MRE) είναι ακόμα μία μη επεμβατική μέθοδος για τη διάγνωση την ίνωσης στους ασθενείς. Από ένα μικρό αριθμό μελετών φαίνεται να έχει μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια, αλλά ακόμα δεν έχουν διευκρινιστεί ποιες τιμές πρέπει να χρησιμοποιηθούν ως κατώφλι “cut off” για τη σταδιοποίηση της νόσου (51).

### 3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ - LIPIDOMICS ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

---

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

---

Τα λιπίδια είναι μία ετερογενής ομάδα ενώσεων οι οποίες είναι (σχεδόν) αδιάλυτες σε υδατικό διάλυμα και διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Τα λιπίδια μπορούν να ταξινομηθούν σε 8 κατηγορίες με βάση τη χημική δομή τους (Πίνακας 1). Επιπλέον, τα λιπίδια, με βάση τη δυνατότητα να υδρολυθούν διαχωρίζονται στα σύνθετα λιπίδια, που υδρολύονται σε απλούστερες ενώσεις και στα απλά λιπίδια που δεν υδρολύονται. Με βάση την πολικότητά τους ταξινομούνται στα ουδέτερα και στα πολικά λιπίδια (54).

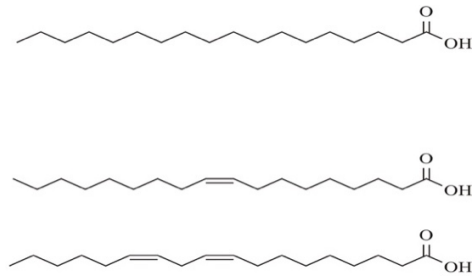
#### Πίνακας 1. Κατηγορίες Λιπιδίων

A.A.	Κατηγορίες Λιπιδίων
1	Λιπαρά Οξέα (Fatty acyls, FA)
2	Γλυκερολιπίδια ή Γλυκερίδια (Glycerolipids, GL)
3	Γλυκεροφωσφολιπίδια (Glycerophospholipids, GP)
4	Σφιγγολιπίδια (Sphingolipids, SP)
5	Στεροειδή (Sterol lipids, ST)
6	Λιπίδια πρενόλης (Prenol lipids, PR)
7	Σακχαρολιπίδια (Saccharolipids, SL)
8	Πολυκετίδια (Polyketides, PK)

Τα κύρια λιπίδια του πλάσματος είναι τα τριγλυκερίδια, η χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια και τα λιπαρά οξέα.

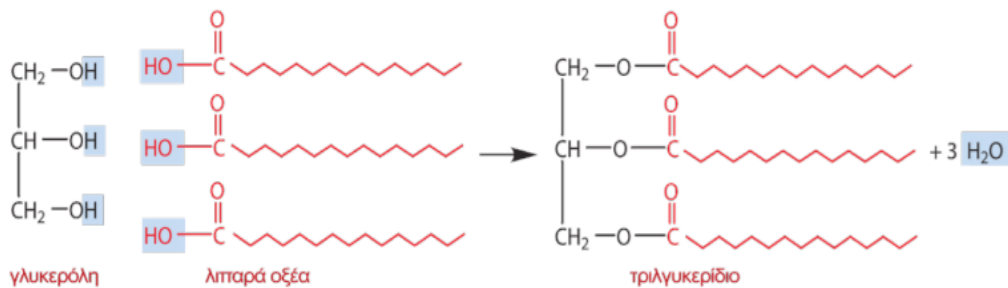
Τα λιπαρά οξέα είναι γραμμικά αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα που βιοσυνθέτουν οι οργανισμοί ή προσλαμβάνουν με τη διατροφή. Πάντα έχουν ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα και αυτό οφείλεται στον μηχανισμό βιοσύνθεσής τους. Ανάλογα με την ύπαρξη διπλού δεσμού διακρίνονται σε ακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς κυρίως με cis και σπάνια με trans γεωμετρία και στα κορεσμένα που δεν περιέχουν διπλούς δεσμούς. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που έχουν έναν διπλό δεσμό χαρακτηρίζονται μονοακόρεστα, ενώ όσα έχουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. (Εικόνα 1)





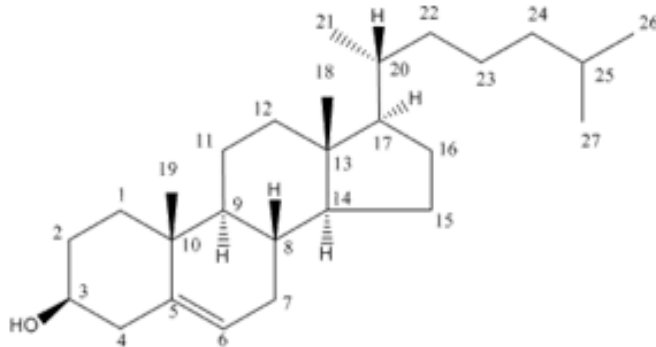
(Εικόνα 1) Εικόνα λιπαρών οξέων

Τα γλυκερολιπίδια ή γλυκερίδια είναι εστέρες που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της γλυκερόλης με μονοκαρβοξυλικά οξέα. Επειδή η γλυκερόλη είναι αλκοόλη που έχει τρεις υδροξυλομάδες (OH) υπάρχουν μονο-,δι- και τριεστέρες. Τα τριγλυκερίδια είναι τριεστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα και βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο πλάσμα του αίματος. Τα τριγλυκερίδια που συντίθενται από το ίδιο λιπαρό οξύ ονομάζονται απλά τριγλυκερίδια, ενώ όσα συντίθενται από δύο ή τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα ονομάζονται μικτά τριγλυκερίδια. (Εικόνα 2)



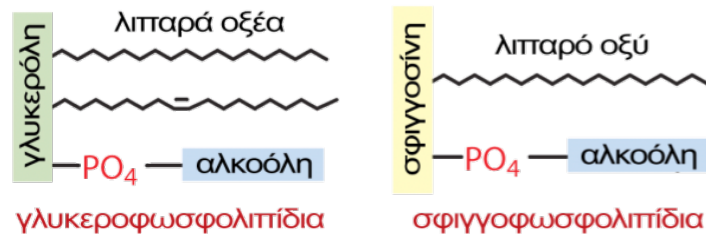
(Εικόνα 2) Εικόνα ενός γλυκεριδίου

Τα στεροειδή λιπίδια είναι λιπίδια με κοινό βασικό σκελετό το σύστημα των τεσσάρων δακτυλίων. Πρόκειται για ένα σημαντικό συστατικό της λιπιδικής μεμβράνης μαζί με τα γλυκεροφωσfolιπίδια και τη σφιγγομυελίνη. Το κύριο στεροειδές στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η χοληστερόλη (Εικόνα 3)



(Εικόνα 3) Εικόνα μίας χοληστερόλης

Τα φωσφολιπίδια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα γλυκεροφωσφολιπίδια και τα σφιγγοφωσφολιπίδια. Τα πρώτα έχουν ως βασικό σκελετό την αλκοόλη γλυκερόλη και τα δεύτερα τη σφιγγοσίνη. Σε κάθε περίπτωση, η γλυκερόλη ή η σφιγγοσίνη συνδέονται με ένα ή δύο λιπαρά οξέα και μία φωσφορική ομάδα στην οποία συνδέεται μία αλκοόλη. (Εικόνα 4)



(Εικόνα 4) Εικόνα γλυκεροφωσφολιπιδίου και σφιγγοφωσφολιπιδίου

Ο ρόλος των λιπιδίων στα κύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες αλλά και την συνολική ομοιοστασία του οργανισμού είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Είναι απαραίτητα δομικά στοιχεία των κυτταρικών μεμβρανών και πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση προσταγλανδινών, ορμονών και χολικών οξέων. Επιπλέον, τα λιπίδια συμμετέχουν στην αποθήκευση ενέργειας, στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στη κυτταρική αύξηση και τέλος στη μετάδοση σημάτων απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Συνεπώς, οι διαταραχές της σύνθεσης και του μεταβολισμού των λιπιδίων φαίνεται να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, όπως του ΣΔ2, της παχυσαρκίας, της NAFLD αλλά και του καρκίνου.

Είναι λοιπόν σημαντική η συνολική και λεπτομερής ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων του πλάσματος με απώτερο σκοπό τη μελέτη των παθοφυσιολογικών μηχανισμών για την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου αλλά και η ανεύρεση αξιόπιστων βιοδεικτών για την ανίχνευση και την παρακολούθηση της νόσου και της επίδραση της θεραπευτικής αγωγής (55).

Τα Lipidomics αποτελούν ένα διακριτό πεδίο της μεταβιονομικής (Metabonomics) και μελετούν μια κατηγορία από το σύνολο των μεταβολιτών που υπάρχουν στον οργανισμό που είναι τα λιπίδια με τη βοήθεια κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών. (56, 57) Ο όρος "lipidome" χρησιμοποιείται για να περιγράψει το συνολικό λιπιδικό προφίλ ενός κυττάρου, ιστού, οργανισμού ή οικοσυστήματος και είναι μία υποκατηγορία του "metabolome" το οποίο περιλαμβάνει τις άλλες τρεις σημαντικές κατηγορίες των βιολογικών μορίων: πρωτεΐνες/αμινοξέα, σάκχαρα, νουκλεϊκά οξέα (58). Με την προσέγγιση αυτή καθίσταται δυνατή η μελέτη της δομής και της λειτουργίας των λιπιδίων ("lipidome") που παράγονται σε ένα κύτταρο ή σε ένα οργανισμό όπως και η μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με άλλα λιπίδια, πρωτεΐνες και μεταβολίτες.(57) Επίσης, είναι εφικτή η αναγνώριση διαταραχών που συμβαίνουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων και σε σηματοδοτικά

μονοπάτια διαμεσολαβούμενα από λιπίδια, τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική ομοιοστασία τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (57, 59).

Οι κύριες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε βιολογικά υγρά, κύτταρα και ιστούς είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, η χρωματογραφία ιονανταλλαγής, η αέρια χρωματογραφία και η χρωματογραφία μάζας παρέχουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση όλων των λιπιδίων που υπάρχουν σε ένα δείγμα (57, 60, 61). Παρόλα αυτά, οι πειραματικές διαδικασίες προσδιορισμού της σύστασης των λιπιδίων με τις παραπάνω μεθόδους είναι αρκετά χρονοβόρες και συνήθως απαιτούνται περισσότερα από ένα βήματα με προεπιλογή των πειραματικών συνθηκών, καθιστώντας τις τεχνικές αυτές ακατάλληλες για την καθημερινή κλινική πράξη.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy,  $^1\text{H}$  NMR) είναι μια ευαίσθητη πυρηνική αναλυτική τεχνική με πολλές εφαρμογές στις Βιοϊατρικές Επιστήμες. Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βασίζεται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων οι οποίοι είναι τοποθετημένοι σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR παρέχει μια γρήγορη και συνολική ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων ενός δείγματος μέσα σε λίγα λεπτά και με μικρή ή καθόλου προεπεξεργασία.

### 3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

---

Οι λιποπρωτεΐνες ή λιποπρωτεϊνικά σωματίδια είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων (χοληστερόλης, εστέρων της χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων) και πρωτεϊνών που ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες. Αποτελούνται από έναν μη πολικό, υδρόφοβο πυρήνα ο οποίος περιλαμβάνει τριγλυκερίδια και εστέρες της χοληστερόλης και περιβάλλονται από μια πολική, υδατοδιαλυτή επιφανειακή στιβάδα που περιέχει φωσφολιπίδια, ελεύθερη ή μη εστεροποιημένη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες.

Οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες με βάση τη διαφορά πυκνότητας που παρουσιάζουν με την τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης:

- α) Χυλομικρά με πυκνότητα μικρότερη από 0.096g/ml ( $d < 0.096\text{g/ml}$ )
- β) Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL),  $d = 0.096\text{-}1.006\text{ g/ml}$
- γ) Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL),  $d = 1.006\text{-}1.019\text{ g/ml}$
- δ) Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL),  $d = 1.019\text{-}1.063\text{g/ml}$
- ε) Λιποπρωτεΐνη (α) [Lp(a)],  $d = 1.060\text{-}1.100\text{ g/ml}$
- στ) Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL),  $d = 1.063\text{-}1.210\text{ g/ml}$

Οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ή HDL λιποπρωτεΐνες (High Density Lipoproteins) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων που διαφέρουν ως προς την πυκνότητα, το μέγεθος, τη πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση και τις βιολογικές τους ιδιότητες. Η πυκνότητά τους είναι 1.21 g/ml ενώ το μέσο μέγεθός τους κυμαίνεται από 8–10 nm. (62)

Με βάση την πυκνότητά τους, τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται σε δυο κύρια υποκλάσματα: HDL<sub>2</sub> (1.063–1.125 g/mL) και HDL<sub>3</sub> (1.125–1.21 g/mL).(63) Με βάση το μέγεθος έχουν προσδιοριστεί με ηλεκτροφόρηση τα παρακάτω υποκλάσματα: HDL<sub>2b</sub> (9.7–12.0 nm), HDL<sub>2a</sub> (8.8–9.7 nm), HDL<sub>3a</sub> (8.2–8.8 nm), HDL<sub>3b</sub> (7.8–8.2 nm), HDL<sub>3c</sub> (7.2–7.8 nm) και με NMR: μεγάλου μεγέθους HDL σωματίδια (8.8–13.0 nm), μεσαίου μεγέθους HDL σωματίδια (8.2–8.8 nm) και μικρού μεγέθους HDL σωματίδια (7.3–8.2 nm) (64, 65). Επιπλέον, με βάση το σχήμα των σωματιδίων διακρίνονται τα σφαιρικά HDL(α-HDL) και τα preβ-HDL σωματίδια που έχουν δισκοειδές σχήμα (65).

Βασικός ρόλος της HDL είναι η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Παρουσιάζει επίσης σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αντιαποπρωτικές ιδιότητες. Σημαντικό ρόλο στη δομή και στη λειτουργία των HDL σωματιδίων διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες των HDL σωματιδίων όπως οι απολιποπρωτεΐνες, ένζυμα, πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, πρωτεΐνες οξειάς φάσης κλπ. Οι σημαντικότερες από αυτές τις πρωτεΐνες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δομή και λειτουργία του μορίου είναι η απολιποπρωτεΐνη AI (apoAI), apoE, ApoC, LCAT, PON1, PAF-AH (LpPLA2) και η CETP (62).

Τα κύρια συστατικά των λιπιδίων που βρίσκονται στο σωματίδιο της HDL είναι τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη κυρίως με την εστεροποιημένη της μορφή. Τα φωσφολιπίδια βρίσκονται σε ποσοστό 35–50% επί του συνολικού ποσοστού των λιπιδίων, με την φωσφατιδυλοχολίνη να είναι το κύριο φωσφολιπίδιο (32-45% των συνολικών λιπιδίων της HDL) και τη σφιγγομυελίνη να ακολουθεί σε ποσοστό 5-10%. Τα τριγλυκερίδια, που βρίσκονται στον πυρήνα του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου απαντούν σε ποσοστό 5-12% (62, 66).

## Πίνακας 2. Σύσταση της HDL λιποπρωτεΐνης

Είδη λιπιδίων	Σύσταση HDL (επί % των συνολικών λιπιδίων της HDL)	Κύριες υποκατηγορίες
Φωσφολιπίδια	35–50	Φωσφατιδυλοχολίνη
Φωσφατιδυλοχολίνη	33–45	16:0/18:2, 18:0/18:2, 16:0/20:4, 16:0/18:1
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	0.5–5	16:0, 18:0, 18:1, 18:2
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	0.5–1.5	16:0/18:2, 18:0/18:2, 18:0/20:4
Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη	0.5–1.5	18:0/20:3, 18:0/20:4
Πλασμαλογόνα	0.5–1.5	18:0/20:4, 16:0/20:4, 18:1/20:4, 18:0/18:2, 16:0/22:6
Φωσφατιδυλοσερίνη	0.02–0.04	16:0/18:0
Φωσφατιδυλογλυκερόλη	ND	18:1/20:2
Φωσφατιδικό οξύ	ND	20:0/20:4, 20:2/20:4, 18:2/20:1
Καρδιολιπίνη	0.2	
Σφιγγολιπίδια	5–10	Σφιγγομυελίνη
Σφιγγομυελίνη	5–10	18:1/16:0, 18:2/24:0, 18:1/24:1, 18:2/22:0, 18:1/22:1
Κεραμίδια	0.05	24:0, 24:1, 23:0, 22:0, 16:0
S1P	0.01–0.02	
Σφιγγοφωσφορυλχολίνη	0.0005	
Στεροειδή	5–10	Χοληστερόλη
Τριγλυκερίδια	5–12	18:1/16:0/18:1, 18:2/16:0/18:1
Εστέρες Χοληστερόλης	30–40	Λινελαϊκός εστέρας χοληστερόλης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η HDL είναι υπεύθυνη για την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης και διαθέτει αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις. Τα χαμηλά επίπεδα της HDL-χοληστερόλης θεωρούνται σημαντικός παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου καθώς μία αύξηση της τάξης 1 mg/dL σχετίζεται με μείωση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου της τάξεως 2% στους άνδρες και 3% στις γυναίκες (67). Όμως, η HDL λιποπρωτεΐνη είναι ένα σωματίδιο με μεγάλη ετερογένεια και βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν πως οι ιδιότητες του σωματιδίου δεν καθορίζονται μόνο από την περιεκτικότητα του σωματιδίου σε χοληστερόλη αλλά από τη συνολική πρωτεϊνική και λιπιδική σύσταση αυτού (68, 69).

Υπάρχουν μελέτες που έχουν δημοσιευτεί στις οποίες διερευνώνται οι αλλαγές στη λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών σε παθολογικές καταστάσεις (70-74). Ειδικότερα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η σύσταση της HDL σε φωσφολιπίδια αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη διαδικασία της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (75, 76). Οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες υφίστανται δομικές τροποποιήσεις που ρυθμίζονται από διάφορους μηχανισμούς, όπως η οξειδωση και η γλυκίωση. Αυτές οι δομικές μεταβολές επηρεάζουν τις ιδιότητες του σωματιδίου και είναι πιθανό να οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητάς του και να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης (77). Έχει παρατηρηθεί πως η χρόνια φλεγμονή, που θεωρείται καρδιαγγειακός παράγοντας κινδύνου, μειώνοντας τα φωσφολιπίδια και προκαλώντας μεταβολές στις πρωτεΐνες της HDL μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία του μορίου της (78). Συμπερασματικά, η ανάλυση της συνολικής σύστασης των λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών μπορεί να συμβάλει στην ανάδειξη συστατικών των λιπιδίων που εμπλέκονται στη δυσλειτουργικότητα του σωματιδίου και σε παθογενετικούς μηχανισμούς μιας παθολογικής κατάστασης.

### 3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD

---

Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία αναφέρονται μελέτες με Lipidomics προσέγγιση σε ασθενείς με NAFLD (27-29). Οι παραπάνω μελέτες στόχο έχουν την ανάδειξη διαταραχών σε συστατικά των λιπιδίων του ορού ή του ήπατος για να ανευρεθούν παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί και νεότεροι βιοδείκτες για την εξέλιξη της νόσου, όπως η συνολική αποτύπωση του lipidome της νόσου (79). Επιπλέον, με lipidomics προσέγγιση έχουν περιγραφεί διαφορές στη συνολική σύσταση των λιπιδίων σε ασθενείς με HCC (79, 82, 83.) Στη βιβλιογραφία προτείνονται ως βιοδείκτες οι μεταβολίτες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του πλάσματος. Ειδικότερα, το 11,12-διϋδροξυ-εικοσατριενοϊκό οξύ προτείνεται ως μη επεμβατικός βιοδείκτης για την εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα (84).

Σε ότι αφορά τη μελέτη της σύστασης της HDL λιποπρωτεΐνης, υπάρχουν πολύ περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα. Σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017, έγινε μελέτη των διαταραχών των λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς, με αυξημένα σκορ μη επεμβατικών προγνωστικών μοντέλων της NAFLD. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη συμμετείχαν 173 ασθενείς, στους οποίους έγινε αρχικά υπολογισμός του Fatty Liver Index, και στη συνέχεια μελετήθηκε με φασματοσκοπία NMR το λιποπρωτεϊνικό προφίλ των ασθενών. Στους ασθενείς με FLI > 60, δηλαδή σε ασθενείς με λιπώδη διήθηση ήπατος παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και αύξηση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο σωματίδιο της HDL σε σχέση με τους ασθενείς με FLI < 60 (85)

## 4 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

### 4.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

#### 4.1.1 Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή δειγμάτων

---

Ο υπό μελέτη πληθυσμός περιλαμβάνει 20 ασθενείς με επιβεβαιωμένη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, οι οποίοι προσήλθαν στα Εξωτερικά Ιατρεία της Γαστρεντερολογικής κλινικής. Η διάγνωση της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος βασίστηκε στο υπερηχογράφημα ήπατος και στον αποκλεισμό άλλων χρόνιων ηπατικών νόσων. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με ιστορικό κατανάλωσης αλκοόλ >20g ημερησίως για τους άνδρες και >10g για τις γυναίκες, ασθενείς με ιστορικό λοίμωξης από τον HBV/HCV, με αυτοάνοση ηπατίτιδα και άλλες χρόνιες ηπατοπάθειες. Τέλος, αποκλείστηκαν ασθενείς που είχαν λάβει στο παρελθόν φάρμακα που προκαλούν στεάτωση όπως κορτιζόνη, αμιωδαρόνη, μεθοτρεξάτη και ταμοξιφαίνη.

Ως ομάδα ελέγχου επιλέχθηκαν υγιή άτομα με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό, ενώ η ομάδα της καρδιαγγειακής νόσου (CHD) αποτελείται από 20 ασθενείς με επιβεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο.

Για τη διενέργεια της μελέτης διενεργήθηκε αιμοληψία από τους παραπάνω ασθενείς μετά από 12ωρη νηστεία και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια αιμοληψίας Vacutainer SST II. Στη συνέχεια, για την ολοκλήρωση της πήξης και την απομόνωση του ορού, τα δείγματα, μετά την παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές για 15 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, έγινε συλλογή του ορού, ο οποίος μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια τύπου Cryovials και καταψύχθηκε σε θερμοκρασία -80°C.

#### 4.1.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός και απαιτούμενα αντιδραστήρια

---

Για την εκτέλεση των πειραμάτων απαιτήθηκαν τα παρακάτω όργανα-σκεύη

1. Φασματογράφος Bruker Avance DRX και 500MHz
2. Ζυγός ( Adventurer™, OHAUS)
3. Φυγόκεντρος (Hettich, Universal II)
4. Σωληνάρια NMR (NMR tubes εσωτερικής διαμέτρου 5mm)
5. Πλαστικά σωληνάρια Cryovials (Cryo Tube™ Vials, NUNC)

Για τη διενέργεια των πειραμάτων απαιτήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια

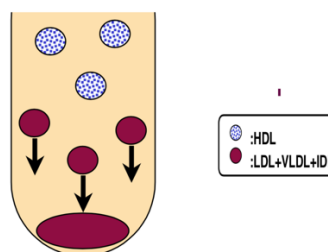
1. Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, MB= 121.14g/ml, Sigma- Aldrich)
2. Χλωριούχο Νάτριο (NaCl, MB=58.44g/ml, Merck)
3. Θεϊκή δεξτράνη (Dextran-Sulfate, Dextralip®, MB=50.000g/ml, 5gr, Sigma-Aldrich)

4. Ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MB=203.30g/mol$ , Merck)
5. Μεθανόλη (Fisher Scientific UK)
6. Χλωροφόρμιο (Fisher Scientific UK)
7. Δευτεριωμένη μεθανόλη (Methanol-d4 με βαθμό δευτερίωσης 99.8%, Aldrich)
8. Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $CDCl_3$  με βαθμό δευτερίωσης 99.8%, Merck)

## 4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.2.1 Αρχή μεθόδου καταβύθισης των λιποπρωτεϊνών - Απομόνωση των HDL λιποπρωτεϊνών.

Αρχικά, για να είναι δυνατή η μελέτη των συστατικών των HDL λιποπρωτεϊνών, βασική προϋπόθεση είναι η απομόνωση τους από τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Ο διαχωρισμός της HDL βασίζεται στο γεγονός ότι τα HDL σωματίδια δεν διαθέτουν απολιποπρωτεΐνη Β, η οποία όμως ανευρίσκεται στο μόρια των IDL, LDL και VLDL λιποπρωτεϊνών. Η απολιποπρωτεΐνη Β είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα αργινίνης. Οι μέθοδοι καταβύθισης επιτρέπουν τον διαχωρισμό της HDL από τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες, καθώς με τη χρήση πολυανιόντων και δισθενών κατιόντων σχηματίζονται αδιάλυτα σύμπλοκα με τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες, αφήνοντας τα HDL λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αδιάλυτα στο υπερκείμενο. (Εικ. 5) (86).



**Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση των μεθόδων καταβύθισης**

Για την απομόνωση των HDL λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ορού ίση με 1,5ml, η οποία τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο.

Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε τα εξής βήματα:

1. Παραμονή των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
2. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο καταβύθισης Dextran Sulfate (20g/L) :  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (1M). Για την καταβύθιση απαιτείται 100 μl αντιδραστηρίου για κάθε



1ml δείγματος. Συνεπώς, στο γυάλινο φιαλίδιο που περιείχε 1,5ml δείγματος προστέθηκε 150μl αντιδραστηρίου και ακολούθησε ανάδευση για 3sec.

3. Το παραπάνω διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
4. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 2500 στροφές.
5. Το διαυγές υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση και περιέχει τις HDL λιποπρωτεΐνες συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε γυάλινα φιαλίδια.
6. Στην περίπτωση ατελούς καταβύθισης των non- HDL λιποπρωτεϊνών λόγω υψηλής τιμής τριγλυκεριδίων στον ορό, το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση ήταν θολερό. Στις περιπτώσεις αυτές, έγινε επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας αφού πρώτα προστέθηκε 1ml από το διάλυμα NaCl (0,15M) και 100ml αντιδραστηρίου.

#### 4.2.2 Εκχύλιση λιπιδίων

Η διαδικασία εκχύλισης λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών βασίστηκε σε παραλλαγή της μεθόδου Blight και Dyer (87) και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Έγινε προσθήκη διαλύματος NaCl- EDTA ποσότητας 0,4ml για κάθε ποσότητα 0,25ml διαλύματος HDL.
2. Εν συνεχεία, για κάθε ποσότητα 0,25 ml διαλύματος HDL έγινε προσθήκη 1ml μεθανόλης και έγινε ανάδευση για 10sec.
3. Ακολούθησε προσθήκη 0,5ml χλωροφορμίου και έγινε ανάδευση για 15sec.
4. Τέλος, ακολούθησε προσθήκη 0,5ml χλωροφορμίου στο ανωτέρω διάλυμα και 0,5ml απιονισμένου νερού και αναδεύτηκε για 15 sec.
5. Το ανωτέρω διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 2400 στροφές.
6. Στη συνέχεια, με μια μικροπιπέτα Pasteur, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην απορροφηθεί η πάνω υδατική φάση και η ενδιάμεση πρωτεϊνική φάση, μεταφέρθηκε η κάτω χλωροφορμική φάση σε γυάλινο φιαλίδιο. Η χλωροφορμική φάση είναι και αυτή που περιέχει τα λιπίδια της HDL λιποπρωτεΐνης.
7. Ακολούθως, στο αρχικό γυάλινο σωληνάριο έγινε προσθήκη 0,5ml χλωροφορμίου και επαναλήφθηκαν τα ανωτέρω στάδια ( ήπια ανάδευση, φυγοκέντρηση, αναρρόφηση χλωροφορμικής φάσης) με στόχο να συλλεχθούν και τα υπόλοιπα λιπίδια.
8. Μετά από ανάμειξη των δύο χλωροφορμικών φάσεων που προέκυψαν από την ανωτέρω διαδικασία διενεργήθηκε εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αζώτου.
9. Όταν ολοκληρώθηκε η εξάτμιση του διαλύτη, τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας.

#### 4.2.3 Προεργασία δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR.

Μετά από παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση τους σε μίγμα δευτεριωμένων διαλυτών. Το ανωτέρω μίγμα περιελάμβανε δευτεριωμένη μεθανόλη (Methyl- $d_3$  alcohol- $d$ , με βαθμό δευτερίωσης 99.8%) και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Chloroform- $d_1$ , με βαθμό δευτερίωσης 99.8%) σε αναλογία 2:1. Η επαναδιάλυση των δειγμάτων είχε ως στόχο την αποφυγή αλληλοεπικάλυψης των σημάτων των πρωτονίων των λιπιδίων με αυτά του διαλύτη. Επιπλέον, για να αποφευχθεί η εξάτμιση σημαντικής ποσότητας των πτητικών διαλυτών, το μίγμα παρασκευάστηκε λίγο πριν την έναρξη του πειράματος και ακολούθως τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε ποσότητα 500μl μίγματος. Τέλος, τα διαλύματα μεταφέρθηκαν με πιπέτα σε ειδικά σωληνάκια NMR (εσωτερικής διαμέτρου 5mm).

#### 4.2.4 Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο φασματοσκοπίας NMR- Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε φασματογράφο 500MHz Avance Bruker DRX, εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11,74 Tesla. Για την καταστολή του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD-90°-t1-90°-tm-90°-FID λήψη). Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 64 παλμών (scans) 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 5000Hz και παλμό 90°. Οι ελευθέρως φθίνουσες επαγωγές (FID), πριν το μετασχηματισμό κατά Fourier στο φάσμα συνάρτησης συχνότητας, πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διερεύνηση γραμμών (line broadening) 0,3Hz, με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας.

Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Topspin 4.0.6.

Για να είναι κατάλληλο το φάσμα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα. Αρχικά, διενεργήθηκε βαθμονόμηση με βάση το σήμα συντονισμού της δευτεριωμένης μεθανόλης στο 3.30ppm. Στη συνέχεια, για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών, έγινε διόρθωση φάσης, μηδενικής και πρώτης τάξης. Ακολούθως, για τον αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών των λιπιδίων, έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης και ακολούθησε καταγραφή της χημικής μετατόπισης των κορυφών του φάσματος ως προς τη μεθανόλη (3.30ppm), η οποία είναι και η ουσία αναφοράς. Τέλος, διενεργήθηκε ολοκλήρωση των περιοχών, για να υπολογιστεί το εμβαδόν μίας απλής ή μιας ομάδας κορυφών και το οποίο είναι ανάλογο του αριθμού των πρωτονίων που περιέχουν. Το ολοκλήρωμα του σήματος συντονισμού των πρωτονίων του άνθρακα 18 της χοληστερόλης ( $\text{C}_{18}\text{H}_3$ ,  $\delta=0,68\text{ppm}$ ) τέθηκε ίσο με την τιμή 1, για να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους. Στη συνέχεια, οι τιμές των ολοκληρωμάτων των σημάτων

συντονισμού των υπόλοιπων λιπιδίων υπολογίστηκαν αναλογικά με την τιμή του ολοκληρώματος της χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, δεδομένου του αριθμού των πρωτονίων κάθε σήματος, οι τιμές των ολοκληρωμάτων των υπόλοιπων λιπιδίων ανάγονται με βάση την τιμή του ολοκληρώματος της χοληστερόλης.

## 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1.1 Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνολικά τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και οι βιοχημικές παράμετροι των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη και των οποίων έγινε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του λιπιδικού προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών.

**Πίνακας 3. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών.**

	<b>Ομάδα Ελέγχου</b>	<b>Ασθενείς με NAFLD<sup>α</sup></b>	<b>Ασθενείς με CHD<sup>β</sup></b>
Αριθμός	20	20	20
Ηλικία (έτη)	53.65 ± 11.97	49.40 ± 12.68	54.80 ± 9.24
Φύλο (Α/Γ)	11/9	11/9	14/6
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	199.05 ± 36.43	214.80 ± 46.93	194.40 ± 48.41
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	115.15 ± 38.35	135.10 ± 42.08	128.75 ± 42.88
HDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	47.75 ± 8.13	46.05 ± 10.44	42.35 ± 8.27
LDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	128.3 ± 31.73	142.20 ± 39.18	126.30 ± 43.39
Γλυκόζη (mg/dL)	93.89 ± 7.85	98.10 ± 11.79	100.59 ± 15.49

**α. NAFLD: Non-alcoholic Fatty Liver Disease, β. CHD: Coronary Heart Disease**

Από τους 20 ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος που έλαβαν μέρος στη μελέτη, οι 11/20 ήταν άνδρες, οι 11/20 πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης του μεταβολικού συνδρόμου και μόνο 1 από τους 20 είχε ιστολογικά επιβεβαιωμένη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών ήταν 49,4 έτη και η μέση τιμή γλυκόζης νηστείας ήταν 98,1(mg/dl). Σε ό,τι αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ τους, η μέση τιμή της ολικής χοληστερόλης ήταν 214,8(mg/dl), η μέση τιμή των τριγλυκεριδίων ήταν 135,1 (mg/dl), της LDL-χοληστερόλης 142,2 (mg/dl) και της HDL-χοληστερόλης 46,05 (mg/dl). Από τους 20 ασθενείς με επιβεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο, οι 14 ήταν άνδρες και οι 6 ήταν γυναίκες, και η μέση ηλικία της ομάδας ήταν τα 54,8 έτη. Η μέση τιμή γλυκόζης νηστείας ήταν 100,5 (mg/dl), η μέση τιμή ολικής χοληστερόλης 194,8 (mg/dl), των τριγλυκεριδίων 128,75 (mg/dl), της LDL- χοληστερόλης 126,3 (mg/dl) και της HDL- χοληστερόλης 42,35 (mg/dl). Η λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών των ασθενών με NAFLD συγκρίθηκε με αυτή της ομάδας των υγιών αλλά και με αυτή των ασθενών με επιβεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο.

## 5.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

---

Στον πίνακα 4α παρουσιάζεται η λιπιδική σύσταση των HDL στα δομικά συστατικά τους στους υγιείς, στους ασθενείς με NAFLD και στους ασθενείς με CHD. Στο κλάσμα των HDL προσδιορίστηκαν τα λιπίδια του πυρήνα, δηλαδή η εστεροποιημένη χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια, καθώς και τα λιπίδια επιφανείας, δηλαδή η ελεύθερη χοληστερόλη, η φωσφατιδυλοχολίνη, η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, τα πλασμαλογόνα, η σφιγγομυελίνη και τα υπόλοιπα σφιγγολιπίδια που αντιστοιχούν κυρίως στα κεραμίδια. Επιπλέον προσδιορίστηκε η % σύσταση των συνολικών λιπιδίων του πυρήνα και των λιπιδίων της επιφανείας, όπως και οι λόγοι ολική χοληστερόλη/ φωσφολιπίδια, εστεροποιημένη/ελεύθερη χοληστερόλη, φωσφατιδυλοχολίνη/ σφιγγομυελίνη και ο λόγος φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη/φωσφατιδυλοχολίνη.

Από τα φάσματα NMR έγινε αρχικά προσδιορισμός της συγκέντρωσης των λιπιδίων του κλάσματος των HDL και ακολούθησε αναγωγή των τιμών σε επί της 100 της συνολικής λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών.

Επιπλέον, στον Πίνακα 4β παρουσιάζεται το προφίλ των λιπαρών οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών στις υπό μελέτη ομάδες. Συνολικά, έγινε προσδιορισμός της % σύστασης σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, σε ακόρεστα, σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Από την ομάδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προσδιορίστηκε το λινελαϊκό οξύ, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ, το αραχιδονικό οξύ και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ. Τέλος, υπολογίστηκε και το μέσο μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων και στις 3 υπό μελέτη ομάδες.

### 5.2.1 *Λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών των ασθενών με NAFLD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

---

Από τη σύγκριση της λιπιδικής σύστασης των HDL των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος με την ομάδα ελέγχου (υγιείς) παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στην περιεκτικότητα της σε συγκεκριμένα φωσφολιπίδια και συγκεκριμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Στο κλάσμα της HDL των ασθενών με NAFLD παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της περιεκτικότητας σε φωσφατιδυλοχολίνη (PC) (32.21 vs 34.05,  $p < 0.012$ ) και σε φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI) (1.35 vs 2.01,  $p < 0.023$ ) σε σχέση με των υγιών και αύξηση της περιεκτικότητας των ολικών σφιγγολιπιδίων. Η αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως στον εμπλουτισμό του σωματιδίου των HDL με τα υπόλοιπα σφιγγολιπίδια και κυρίως με κεραμίδια (1.40 vs 0.42,  $p < 0.00$ ). Επιπρόσθετα, ο λόγος φωσφατιδυλοχολίνη/σφιγγομυελίνη ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος

στους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος από ότι στην ομάδα ελέγχου (5.62 vs 4.77,  $p < 0.00$ ). Τέλος, στους ασθενείς με NAFLD παρατηρήθηκε μείωση της περιεκτικότητας του σωματιδίου σε ολική χοληστερόλη, η οποία οφείλεται κυρίως στην εστεροποιημένη της μορφή και αύξηση των τριγλυκεριδίων χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές.

**Πίνακας 4α: Λιπιδική Σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών (moles/ 100 moles των λιπιδίων)**

	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με NAFL	Ασθενείς με CHD
<b>% Χοληστερόλη</b>	41.64 ± 2.07	41.44 ± 2.98	40.12 ± 2.81
Εστεροποιημένη (EC)	32.08 ± 1.82	31.76 ± 2.14	30.52 ± 2.49*
Ελεύθερη (FC)	9.56 ± 1.06	9.68 ± 1.19	9.60 ± 1.19
<b>% Τριγλυκερίδια (TG)</b>	5.38 ± 1.44	5.67 ± 2.00	5.78 ± 1.6
<b>% Φωσφολιπίδια (PLs)</b>	52.98 ± 2.1	52.89 ± 2.85	54.1 ± 2.43
• <b>Γλυκεροφωσφολιπίδια GPLs)</b>	41.03 ± 2.03	39.60 ± 2.73	42.56 ± 2.31*, **
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)	34.05 ± 1.61	32.21 ± 2.69*	33.51 ± 2.28
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC)	2.49 ± 0.51	2.56 ± 0.79	2.58 ± 0.77
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)	1.18 ± 0.31	1.04 ± 0.34	1.07 ± 0.36
Φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI)	2.01 ± 0.61	1.35 ± 0.44*	3.08 ± 1.32**, **
Υπόλοιπα Λιπίδια <sup>α</sup>	2.42 ± 1.77	3.63 ± 2.80	2.74 ± 2.37
• <b>Αιθερικά Γλυκερολιπίδια (Ether GLs)</b>	4.95 ± 0.98	5.27 ± 1.48	4,81 ± 1.27
Πλασμαλογόνα	1.66 ± 0.29	1.84 ± 0.44	1.74 ± 0.44
Υπόλοιπα Αιθερικά Λιπίδια <sup>β</sup>	3.29 ± 0.9	3.42 ± 1.25	3.07 ± 1.00
• <b>Σφιγγολιπίδια (SLs)</b>	7.01 ± 0.63	8.03 ± 0.63**	6.74 ± 0.77**
Σφιγγομυελίνη (SM)	6.58 ± 0.66	6.62 ± 0.71	5.94 ± 0.77**, **
Υπόλοιπα Σφιγγολιπίδια <sup>γ</sup>	0.42 ± 0.19	1.40 ± 0.31**	0.80 ± 0.38**, **
<b>% Λιπίδια του Πυρήνα</b>	37.46 ± 2.27	37.43 ± 2.03	36.3 ± 2.54
<b>% Λιπίδια της Επιφάνειας</b>	62.54 ± 2.27	62.57 ± 2.03	63.7 ± 2.54
<b>Ολική Χοληστερόλη/ Φωσφολιπίδια</b>	0.79 ± 0.07	0.79 ± 0.1	0.74 ± 0.08
<b>Εστεροποιημένη/Ελεύθερη Χοληστερόλη</b>	3.40 ± 0.42	3.31 ± 0.34	3.23 ± 0.46
<b>Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη/ Φωσφατιδυλοχολίνη</b>	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01**	0.04 ± 0.01 <sup>+</sup>

\*  $p < 0.05$  και \*\*  $p < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου <sup>+</sup>  $p < 0.05$  και <sup>++</sup>  $p < 0.01$  σε σύγκριση με τους ασθενείς με NAFL  
α: κυρίως φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλογλυκερόλη, β: PAF, γ: κυρίως κεραμίδιο

Ομοίως άλλες διαφορές που παρατηρήθηκαν χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές ήταν η αύξηση της % περιεκτικότητας του σωματιδίου σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) και σε πλασμαλογόνα και η μείωση της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) στους ασθενείς με NAFLD σε σχέση με τους υγιείς.

Σε ό,τι αφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων, στατιστικά σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν σε επιμέρους πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4β, η % περιεκτικότητα του σωματιδίου σε εικοσιπεντανοϊκό οξύ, αραχιδονικό οξύ και εικοσιδιεξανοϊκό οξύ ήταν σε χαμηλότερα ποσοστά στους ασθενείς με NAFL σε σχέση με τους υγιείς και το μέσο μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων ήταν μικρότερο (15.18 vs 16.67,  $p<0.05$ ).

**Πίνακας 4β. Προφίλ Λιπαρών Οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών (moles/ 100 moles των λιπιδίων)**

Λιπαρά Οξέα	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με NAFLD	Ασθενείς με CHD
% Κορεσμένα	38.13 ± 4.44	39.12 ± 2.4	40.9 ± 4.13*
% Ακόρεστα	61.87 ± 4.44	60.88 ± 2.4	59.1 ± 4.13*
% Μονοακόρεστα	5.92 ± 3.76	6.64 ± 3.56	7.84 ± 3.69
% Πολυακόρεστα	55.95 ± 3.79	54.24 ± 3.91	51.27 ± 4.83**, +
➤ Λινελαϊκό Οξύ	19.54 ± 2.72	19.80 ± 2.78	17.39 ± 2.85*, ++
➤ Εικοσιπεντανοϊκό και Αραχιδονικό Οξύ	13.13 ± 2.84	10.95 ± 1.98**	10.41 ± 1.09**
➤ Εικοσιδιεξανοϊκό Οξύ	4.04 ± 0.86	3.51 ± 0.81*	3.02 ± 0.51**, +
Μέσο Μήκος Αλυσίδας Λιπαρών Οξέων	16.67 ± 1.35	15.18 ± 0.52**	15.87 ± 0.99*, +
Κορεσμένα/Ακόρεστα	0.62 ± 0.12	0.64 ± 0.06	0.7 ± 0.11*
Κορεσμένα/Πολυακόρεστα	0.69 ± 0.11	0.73 ± 0.08	0.81 ± 0.16**, +
* $p<0.05$ και ** $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου + $p<0.05$ και ++ $p<0.01$ σε σύγκριση με τους ασθενείς με NAFLD			

### 5.2.2 Λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών των ασθενών με NAFLD και ασθενών με Εγκατεστημένη Καρδιαγγειακή Νόσο.

Όταν έγινε σύγκριση της λιπιδικής σύστασης της HDL λιποπρωτεΐνης των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και των ασθενών με επιβεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο

παρατηρήθηκαν κυρίως διαφορές που αφορούν την περιεκτικότητα της HDL στα συνολικά γλυκεροφωσφολιπίδια και στα σφιγγολιπίδια.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4β, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση της περιεκτικότητας του πυρήνα των HDL σωματιδίων σε εστεροποιημένη χοληστερόλη και αύξηση σε τριγλυκερίδια στους υγιείς, στους ασθενείς με NAFL και σε αυτούς με εγκατεστημένη CHD, χωρίς όμως οι αλλαγές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Η HDL των ατόμων με NAFLD παρουσίαζε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών γλυκεροφωσφολιπιδίων (GLPs) (39.60 vs 42.56,  $p < 0.00$ ) και συγκεκριμένα φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI) σε σχέση με την HDL των ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο (1.35 vs 3.08,  $p < 0.00$ ). Η περιεκτικότητα των σωματιδίων σε ολικά σφιγγολιπίδια βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένη στην HDL των ασθενών με NAFLD σε σχέση με την HDL των CHD ασθενών. Η αύξηση αυτή οφείλεται τόσο στην σφιγγομυελίνη (6.62 vs 5.94,  $p < 0.00$ ) όσο και στα κεραμίδια (1.40 vs 0.80,  $p < 0.00$ ). Ομοίως και ο λόγος των δυο κύριων φωσφολιπιδίων της επιφάνειας των HDL Φωσφατιδυλοχολίνη/Σφιγγομυελίνη ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (5.62 vs 4.51,  $p < 0.00$ ).

Οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν παρόμοιες μεταβολές με τους CHD σε σχέση με τους υγιείς όσον αφορά στα επιμέρους γλυκεροφωσφολιπίδια, δηλαδή τη φωσφατιδυλοχολίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, καθώς και στα πλασμαλογόνα. Πιο συγκεκριμένα και στους NAFLD και στους CHD ασθενείς, παρατηρείται πτωτική τάση της ολικής χοληστερόλης, των εστέρων χοληστερόλης, της PC και της PE και αυξητική τάση των τριγλυκεριδίων, της LPC, και των πλασμαλογόνων σε σχέση με τους υγιείς.

Επιπλέον, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τόσο στο σύνολο τους όσο και τα επιμέρους που υπολογίστηκαν (λινελαϊκό οξύ, εικοσιπεντανοϊκό οξύ, εικοσιδιεξανικό οξύ) στο κλάσμα της HDL ήταν αυξημένα στους NAFLD ασθενείς εν συγκρίσει με τους καρδιαγγειακούς, με το λινελαϊκό οξύ να παρουσιάζει την πιο μεγάλη αύξηση. Τέλος, τόσο το μέσο μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων όσο και ο λόγος κορεσμένα/πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ήταν μικρότερα από ότι στους καρδιαγγειακούς ασθενείς (15.18 vs 15.87,  $p < 0.015$  και 0.73 vs 0.81,  $p < 0.002$ , αντίστοιχα).



## 6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR της λιπιδικής σύστασης της HDL λιποπρωτεΐνης ανέδειξε σημαντικές διαφορές στους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου της HDL και κατά συνέπεια τη λειτουργία της. Οι διαφορές αφορούν κυρίως τη σύσταση των επιμέρους φωσφολιπιδίων στο σωματίδιο της HDL, όπως είναι η μειωμένη περιεκτικότητα του σωματιδίου σε φωσφατιδυλοχολίνη και ο εμπλουτισμός των HDL σε σφιγγολιπίδια, κυρίως κεραμίδια. Η HDL λιποπρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης και διαθέτει αντιαθηρογόνες και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι παραπάνω αλλαγές στη λιπιδική σύστασή της θα μπορούσαν να διαταράξουν την αντιαθηρογόνο λειτουργία της και πιθανά συμμετέχουν στον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο που παρουσιάζουν οι ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος.

Από την παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση της περιεκτικότητας του μορίου της HDL σε τριγλυκερίδια. Αν και η αύξηση αυτή δεν έφτασε στα επίπεδα του στατιστικά σημαντικού, συμφωνεί με ευρήματα άλλων μελετητών, τα οποία όμως αφορούσαν σε ασθενείς με αυξημένη πιθανότητα NAFLD και όχι σε επιβεβαιωμένους ασθενείς με την νόσο.(85) Ο εμπλουτισμός της HDL με τριγλυκερίδια παρατηρείται σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη όπως είναι το μεταβολικό σύνδρομο και ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (Σ.Δ.2.) (88-90) Η μεταφορά τριγλυκεριδίων στο μόριο της HDL από τις VLDL διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (Cholesteryl transfer protein, CETP), η δραστικότητα της οποίας έχει βρεθεί πως είναι αυξημένη σε ασθενείς με NAFL (91) . Η αυξημένη απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό, η αυξημένη παραγωγή από το ήπαρ VLDL λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε TG και η ενεργοποίηση της *de novo* lipogenesis στην περίπτωση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος έχει ως συνέπεια την αύξηση της συνολικής περιεκτικότητας του πλάσματος σε TG .(90) Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αυξημένη ανταλλαγή τριγλυκεριδίων και εστέρων χοληστερόλης ανάμεσα στις VLDL και HDL, διαμέσου CETP και τον εμπλουτισμό της HDL με τριγλυκερίδια. (89)

Σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό και με την αυξημένη δραστικότητα της CETP, η περιεκτικότητα της HDL σε εστέρες χοληστερόλης μειώνεται. Η ελάττωση της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη της HDL έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με NAFLD, με μεταβολικό σύνδρομο και διαβητικούς (85, 88, 89) και επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη, αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντική, πιθανά λόγω του μικρού δείγματος των ασθενών.

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητά της HDL σε συγκεκριμένα φωσφολιπίδια. Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών προτείνει πως διαταραχές στο μεταβολισμό των λιπιδίων εμπλέκονται σημαντικά στην παθογένεια της νόσου. (92, 93) Η σύσταση

των φωσφολιπιδίων και το προφίλ των λιπαρών οξέων των ηπατοκυττάρων φαίνεται να παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές στην περίπτωση της NAFLD. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτες με Lipidomics προσέγγιση των ηπατοκυττάρων στους παραπάνω ασθενείς παρατηρήθηκε ελάττωση της PC, της PE και της PI καθώς και αύξηση της LPC και των κεραμιδίων. (94-96) Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε εξίσου μείωση της περιεκτικότητας της HDL σε PC και PI, όπως και αύξηση των κεραμιδίων. Αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικό, παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της HDL αύξηση της LPC και ελάττωση της PE. Πιθανά, οι ομοιότητες αυτές οφείλονται στο γεγονός ότι το ήπαρ διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη σύνθεση και το μεταβολισμό των HDL λιποπρωτεϊνών.(97) Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο για την παραγωγή της lipid-poor ApoA-1, και υπεύθυνο για το 70% της συνολικής apoA-1 των HDL λιποπρωτεϊνών. (98) Η ApoA-1 μετά τη σύνθεση της απελευθερώνεται από το ήπαρ και στη συνέχεια εμπλουτίζεται με χοληστερόλη και φωσφολιπίδια μέσω της δράσης της ηπατικής πρωτεΐνης ATP-binding cassette (ABC) protein A1. (99) Singaraja et al. επιβεβαίωσε ότι η ηπατική ABCA1 είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των nascent HDL και έδειξε πως το ήπαρ συνεισφέρει την πλειοψηφία των φωσφολιπιδίων του μορίου της HDL. (100)

Πιο ειδικά, πρόσφατες μελέτες προτείνουν πως η φωσφατιδυλοχολίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της NAFLD και είναι το μοναδικό φωσφολιπίδιο το οποίο είναι γνωστό ότι απαιτείται για το σχηματισμό των λιποπρωτεϊνών και την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία. Διαταραχή στην ηπατική βιοσύνθεση της PC μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των κυκλοφορούντων VLDL και HDL λιποπρωτεϊνών. (101) Μάλιστα, η μειωμένη συγκέντρωση της PC στο ηπατικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της οδηγεί στο σχηματισμό nascent (πρόωρων/πρόδρομων/μη ώριμων) VLDL λιποπρωτεϊνών με χαμηλές συγκεντρώσεις PC στο μόριο τους. Συνεπώς, η διαταραχή στην απελευθέρωση από τα ηπατοκύτταρα των VLDL θα ήταν ικανή να οδηγήσει σε συσσώρευση των τριγλυκεριδίων εντός των ηπατοκυττάρων, το οποίο έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες ζωικών μοντέλων NAFLD. (101,102) Ακόμη, η φωσφατιδυλοχολίνη επηρεάζει με μηχανισμό negative feedback control την SREBP-1, την πρωτεΐνη που ρυθμίζει τη de novo lipogenesis. Η χαμηλή κυτταρική συγκέντρωση της PC έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τη SREBP-1 και προάγει την μετανάστευση της στον πυρήνα και την ενεργοποίηση έκφρασης λιπογενετικών γονιδίων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της λιπιδικής σταγόνας εντός των ηπατοκυττάρων. (103)

Η χαμηλότερη τιμή της PC στο σωματίδιο της HDL που παρατηρήθηκε, πιθανά αντανakλά τη χαμηλή βιοσύνθεση της PC από τα ηπατοκύτταρα, αλλά δεδομένου ότι η HDL λιποπρωτεΐνη ανταλλάσσει και φωσφολιπίδια εκτός εστέρων χοληστερόλης με τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (και κύτταρα) μέσω της PTLP, το εύρημα θα μπορούσε να οφείλεται και σε επιπρόσθετους μηχανισμούς, οι οποίοι δεν είναι ακόμα γνωστοί. (104) Επιπλέον, η δραστηριότητα της PTLP έχει βρεθεί από ορισμένους μελετητές αυξημένη στην περίπτωση της NAFLD, γεγονός όμως που δεν

επιβεβαιώνεται από άλλες μελέτες. (91,105) Λαμβάνοντας υπόψιν ότι έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου με την αύξηση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος και την αύξηση της περιεκτικότητας των HDL σε TG, στη NAFLD αναμένεται αυξημένη.(104) Εφόσον, η χαμηλή PC των ηπατοκυττάρων οδηγεί σε σχηματισμό VLDL φτωχές σε PC, ακόμα και η ανταλλαγή φωσφολιπιδίων με την HDL θα μπορούσε να οδηγήσει σε χαμηλή συγκέντρωση PC στο σωματίδιο της HDL.

Από την άλλη μεριά, αξίζει να αναφερθεί ότι η ίδια η HDL μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεια της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, η χαμηλή συγκέντρωση της PC στο μόριο της HDL, μπορεί πιθανά να ευθύνεται και αυτή για τις χαμηλές συγκεντρώσεις της PC που παρατηρούνται στα ηπατοκύτταρα των ασθενών με NAFLD. Σε μελέτη ποσοτικού προσδιορισμού της προέλευσης της PC που ανιχνεύεται στα ηπατοκύτταρα παρατηρήθηκε ότι η PC που ανευρίσκεται στο μόριο της HDL προσλαμβάνεται από τα ηπατοκύτταρα και μάλιστα συνεισφέρει σημαντικά στην ηπατική συγκέντρωση της PC in vivo, προσφέροντας όση PC συντίθεται καθημερινά από το ίδιο το ήπαρ. (106) Επομένως, η χαμηλή συγκέντρωση της PC στα ηπατοκύτταρα των ασθενών με NAFLD πιθανά οφείλεται στη χαμηλή σύνθεσή της αλλά και στη μειωμένη μεταφορά της και απόδοσή της από την ίδια την HDL λιποπρωτεΐνη.

Πέρα από την απλή χαμηλή συγκέντρωση της PC των ηπατοκυττάρων που φαίνεται να συμμετέχει στη παθοφυσιολογία της νόσου, ιδιαίτερη σημασία φαίνεται πως έχει ο λόγος PC/PE και αυτό διότι αντανακλά τη δραστηριότητα του ενζύμου N-μεθυλοτρανσφεράση της φωσφατιδυλοαιθανολάμινης (Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT) που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της PC από PE. (107) Στα ηπατοκύτταρα το 30% της συνολικής σύνθεσης της PC προέρχεται από την PE μέσω της δράσης του ενζύμου PEMT. Ο χαμηλός λόγος PC/PM των ηπατοκυττάρων και ερυθροκυττάρων έχει βρεθεί πως σχετίζεται με τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και μάλιστα η απώλεια της δραστηριότητας του PEMT φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης NAFL και NASH. (108,109) Στην παρούσα μελέτη, υπολογίστηκε ο λόγος PE/PC και όπως φαίνεται στον πίνακα ήταν μικρότερος στην περίπτωση της NAFLD. Ο αντίστροφος είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση της HDL στους ασθενείς με NAFLD και πιθανά λόγω απουσίας του ενζύμου PEMT στο σωματίδιο της HDL το εύρημα δε συμφωνεί με άλλους μελετητές και δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα από το λόγο PC/PE στο σωματίδιο της HDL.

Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη είναι ένα βιοδραστικό λιπίδιο και τα επίπεδα της στο πλάσμα μπορεί να προέρχονται είτε από το ίδιο το ήπαρ, είτε από τη δράση της LCAT, είτε από την υδρόλυση της PC μέσω της LpPLA2 (110) Περίπου το 87% της συνολικής λυσοφωσφατιδυλοχολίνης πλάσματος βρίσκεται στο κλάσμα της HDL λιποπρωτεΐνης. (111) Τα αποτελέσματα lipidomics μελετών του πλάσματος ασθενών με NAFLD είναι αντικρουόμενα. (79, 81, 93,) Ωστόσο, σε μελέτες λιπιδικού

προφίλ ηπατοκυττάρων παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της στη νόσο και ιδίως στην περίπτωση της NASH. (94, 96) Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μια ήπια αύξηση της LPC της HDL, η οποία όμως δεν έφτασε τα όρια του στατιστικά σημαντικού. Η αυξητική της τάση θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην αυξημένη σύνθεση της από το ήπαρ, είτε στην αυξημένη δραστηριότητα της LCAT και της LpPLA2, ευρήματα που έχουν παρατηρηθεί σε περιορισμένο αριθμό μελετών και δεν επιβεβαιώνονται από άλλους μελετητές. (91, 105, 112, 113)

Τα κεραμίδια και τα σφιγγολιπίδια προερχόμενα από τα κεραμίδια είναι δομικά συστατικά των μεμβρανών, τα οποία όμως έχουν και λειτουργίες σηματοδοτικών μορίων. Αν και η σύνθεση των κεραμιδίων πραγματοποιείται σε όλα τα όργανα, υπάρχουν δεδομένα από μελέτες σε κυτταρικές σειρές, σε ζωικά μοντέλα και ανθρώπους, τα οποία προτείνουν πως το ήπαρ είναι το κύριο και κεντρικό όργανο σύνθεσης των κεραμιδίων και γενικά παρουσιάζει αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις σφιγγολιπιδίων, ιδίως κεραμιδίων και σφιγγομυελίνης από ότι άλλοι ιστοί. (114) Σε ό,τι αφορά τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, έχει παρατηρηθεί από πλήθος μελετών πως τα επίπεδα τους και κυρίως τα επίπεδα των κεραμιδίων είναι αυξημένα τόσο στα ηπατοκύτταρα NAFLD ασθενών όσο και στο πλάσμα ασθενών με μεταβολικό σύνδρομο. (107, 115) Μάλιστα, προτείνεται πως διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία και στην εξέλιξη της νόσου. (116)

Η σύνθεσή τους πραγματοποιείται μέσω τριών διαφορετικών μονοπατιών, τα οποία είναι α) de novo synthesis μέσω της δράσης του ενζύμου serine palmitoyl-CoA transferase (SPT), β) μέσω της δράσης της σφιγγομυελινάσης (SMase) και μέσω ενός salvage μονοπατιού. Η de novo σύνθεσή τους έχει παρατηρηθεί πως αυξάνεται σε καταστάσεις αυξημένης μεταφοράς στα ηπατοκύτταρα FFA, σε καταστάσεις φλεγμονής (αυξημένη παραγωγή TNF-α και IL-6) και αυξημένου οξειδωτικού στρες εντός των ηπατοκυττάρων, διεργασίες που χαρακτηρίζουν την παθογένεια της NAFL. (116) Πέρα από την αύξηση της de novo σύνθεσης, η φλεγμονή αυξάνει την σύνθεση των κεραμιδίων μέσω ενεργοποίησης της σφιγγομυελινάσης, ενώ η αδιπονεκτίνη φαίνεται και αυτή να επηρεάζει τα επίπεδά τους. Η αδιπονεκτίνη μέσω υποδοχέων φαίνεται να προάγει την έκφραση της ceramidase, ενζύμου που μετατρέπει τα κεραμίδια σε SIP, με συνέπεια την μείωση των επιπέδων τους στα ηπατοκύτταρα. (117) Στην περίπτωση της NAFL, τα χαμηλά επίπεδα της αδιπονεκτίνης πιθανόν συνεισφέρουν στην αυξημένη συγκέντρωση των κεραμιδίων που παρατηρείται στα ηπατοκύτταρα των ασθενών.

Στην περίπτωση της HDL, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων των σφιγγολιπιδίων, η οποία οφείλεται κυρίως στον εμπλουτισμό της HDL σε κεραμίδια. Ο εμπλουτισμός αυτός αντανάκλα πιθανά τόσο την αυξημένη σύνθεσή τους από τα ηπατοκύτταρα και τη μεταφορά τους στο μόριο της lipid-poor apoA1 της HDL όσο και τα αυξημένα επίπεδα έχουν παρατηρηθεί γενικά στο πλάσμα ασθενών με αντίσταση στην ινσουλίνη. (116) Τα ίδια τα κεραμίδια, μάλιστα, μέσω της δράσης τους ως σηματοδοτικά μόρια φαίνεται να συμβάλλουν σε σημαντικό βαθμό στην

παθογένεια της NAFL και της αντίστασης στην ινσουλίνη. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως τα κεραμίδια μειώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη στους σκελετικούς μύες και στο ίδια τα ηπατοκύτταρα, ενώ σε μελέτες ζωικών μοντέλων μετά τη χορήγηση αναστολέων της βιοσύνθεσης των κεραμιδίων παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της αντίστασης της ινσουλίνης. Ακόμη, αν και η αύξηση φλεγμονωδών κυτταροκινών οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή των κεραμιδίων, πιθανολογείται πως και τα ίδια τα κεραμίδια μέσω μηχανισμού ανατροφοδότησης οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών και σε περαιτέρω ενεργοποίηση της φλεγμονής. (118) Επιπλέον, τα κεραμίδια εμπλέκονται στην αύξηση του οξειδωτικού στρες, στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και στην ενεργοποίηση της κυτταρικής απόπτωσης. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις πως τα κεραμίδια μπορεί να ρυθμίζουν τη σύνθεση των HDL λιποπρωτεϊνών και να επηρεάζουν με αυτό τον τρόπο την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Σε μία μελέτη που χρησιμοποίησε τα western diet rat models ως μοντέλα της NAFL, η χορήγηση μυρισίνης, αναστολέα της βιοσύνθεσης των κεραμιδίων, πέρα από τη βελτίωση παραμέτρων αντίστασης ινσουλίνης και της στεάτωσης, παρατηρήθηκε επιπλέον σημαντική αύξηση του ρυθμού παραγωγής της ApoA1 και του ρυθμού παραγωγής της HDL λιποπρωτεΐνης. (119)

Αξιοσημείωτες είναι και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο προφίλ των λιπαρών οξέων της HDL λιποπρωτεΐνης των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στο μόριο της HDL παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση του εικοσαπεντανοϊκού οξέος και αραχιδονικού καθώς και του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει από μελέτες στα ηπατοκύτταρα των ασθενών με NAFLD. (94) Αν και τα συγκεκριμένα λιπίδια επηρεάζονται κυρίως από τη διατροφή και μία δίαιτα πτωχή σε ω-3 θα εξηγούσε εν μέρει τα παραπάνω ευρήματα, το ίδιο το ήπαρ διαθέτει ένζυμα για το σχηματισμό των παραπάνω λιπαρών οξέων με πρόδρομες ουσίες το λινελαϊκό οξύ και τα α-λινολεαϊκό οξύ. Τα ένζυμα υπεύθυνα για την παραπάνω σύνθεση και κυρίως η FADS1 φαίνεται πως παρουσιάζουν ελαττωμένη δραστηριότητα και η διαταραχή αυτή συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου. (94, 120, 121)

Ακόμη, εάν και δεν έφτασε στα όρια στατιστικά σημαντικού παρατηρήθηκε αύξηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων, ευρήματα σύμφωνα και με μελέτες στα ηπατοκύτταρα και στον ορό ασθενών με NAFLD. (36,8) Τα ίδια τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλούν λιποτοξικότητα κυρίως μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων που ρυθμίζουν την κυτταρική απόπτωση και η αυξημένη συγκέντρωσή τους συμβαδίζει με τη σοβαρότητα της νόσου. (120)

Οι ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος παρουσιάζουν αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, έτσι ο δεύτερος στόχος της μελέτης ήταν η σύγκριση της σύστασης της HDL λιποπρωτεΐνης των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος με αυτή των ασθενών με Καρδιαγγειακή Νόσο. Από την παρούσα σύγκριση παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές στη

συγκέντρωση σχεδόν όλων των λιπιδίων της HDL στις δύο νόσους αλλά η σύγκριση ανέδειξε και αξιοσημείωτες διαφορές στη συγκέντρωση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI) και τις συγκεντρώσεις των σφιγγολιπιδίων. Στους ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, η PI αυξήθηκε και τα σφιγγολιπίδια, ιδίως τα κεραμίδια μειώθηκαν, ενώ στους NAFLD ασθενείς η PI μειώθηκε και τα σφιγγολιπίδια, ιδίως τα κεραμίδια αυξήθηκαν.

Η αύξηση της περιεκτικότητας της HDL σε τριγλυκερίδια και η μείωση σε εστεροποιημένη χοληστερόλη αποτελεί συχνό και χαρακτηριστικό εύρημα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Οι μεταβολές στη λιπιδική σύσταση του πυρήνα του σωματιδίου της HDL φαίνεται να επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη δομική ακεραιότητα του σωματιδίου. Ο εμπλουτισμός με τριγλυκερίδια και η μείωση της των εστέρων χοληστερόλης οδηγεί σε ασταθή σωματίδια HDL, τα οποία μέσω αυξημένης υδρόλυσης από την ηπατική λιπάση απομακρύνονται γρήγορα από την κυκλοφορία. Επιπλέον, η σταθερότητα της α-έλικας της apoA1 ενισχύεται από την αύξηση της περιεκτικότητας του πυρήνα σε εστεροποιημένη χοληστερόλη και μειώνεται από τα τριγλυκερίδια. Συνεπώς, οι παραπάνω μεταβολές στη λιπιδική σύσταση του πυρήνα έχουν σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση της apoA1 από την HDL και την απομάκρυνση της από το πλάσμα. (122) Ακόμα, η αύξηση της περιεκτικότητας της HDL σε τριγλυκερίδια έχει φανεί πως μειώνει την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, τόσο επηρεάζοντας την εστεροποίηση της από την LCAT όσο και τους μηχανισμούς απομάκρυνσης της από το ήπαρ (123). Επιπλέον, η μείωση της περιεκτικότητας της HDL σε χοληστερόλη, στα πλαίσια ανταλλαγής της με τριγλυκερίδια μέσω της CETP επηρεάζει και αυτή την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Έχει παρατηρηθεί πως ο εμπλουτισμός της HDL με εστέρες προάγει την απομάκρυνση των εστέρων χοληστερόλης της HDL μέσω των υποδοχέων SR-B1 (124). Οι μεταβολές αυτές στα δομικά συστατικά του πυρήνα της HDL εάν και δεν ήταν τόσο αξιοσημείωτες στην περίπτωση της NAFLD μπορεί να διαταράσσουν τις αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL και να συμβάλλουν εν μέρει στον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο που παρουσιάζουν οι NAFLD ασθενείς.

Η σύσταση των φωσφολιπιδίων της HDL φαίνεται να επηρεάζει και αυτή σημαντικά τη δομή και τη σταθερότητα των HDL λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και να επιδρά και στη λειτουργία της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. (75, 76, 125) Συγκεκριμένα, ο εμπλουτισμός των HDL σωματιδίων με φωσφολιπίδια, αυξάνει το μέγεθος του σωματιδίου και εμποδίζει την απομάκρυνση της lipid poor apoA1 από τα HDL σωματίδια που μεσολαβείται από την CETP. Ακόμη, αλλαγές στη φωσφολιπιδιακή μεμβράνη των HDL μπορούν να επηρεάσουν τη διάταξη και σύνδεση της ApoA1, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της LCAT. Η LCAT είναι το ένζυμο που καταλύει την εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης, αντίδραση που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης και στο σχηματισμό και ωρίμανση των HDL λιποπρωτεϊνών.

Μάλιστα, η ίδια η σύνδεση της LCAT στο σωματίδιο της HDL επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από τη σύσταση των φωσφολιπιδίων, και κυρίως από την περιεκτικότητα σε σφιγγομυελίνη.

Άλλες όμοιες μεταβολές που παρατηρήθηκαν στις δύο ομάδες ασθενών ήταν η μείωση της PC και της PE και η μικρή αύξηση της LPC και των πλασμαλογόνων. Ιδιαίτερη σημασία για τη λειτουργία της HDL φαίνεται να έχει η περιεκτικότητα της HDL σε PC και SM. Η ελάττωση της PC που παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες ασθενών, και ήταν στατιστικά σημαντική διαφορά στους NAFLD ασθενείς συμφωνεί με τα ευρήματα και άλλων μελετών σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. (126) Η PC της HDL αναστέλλει την έκφραση φλεγμονωδών μορίων στο ενδοθήλιο, επομένως η ελάττωση της συγκέντρωσης της στο μόριο της HDL θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη αντιφλεγμονώδη και αντιαθηρογόνο λειτουργία της HDL. (127) Η SM της HDL επηρεάζει τη δομή και τη σταθερότητα του μορίου της HDL και στις περισσότερες μελέτες στην Καρδιαγγειακή Νόσο έχει παρατηρηθεί ελάττωση της στο κλάσμα της HDL. Στην παρούσα μελέτη ελάττωση παρατηρήθηκε μόνο στους καρδιαγγειακούς ασθενείς, ενώ στους NAFL παρατηρήθηκε αύξηση χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικό. Ωστόσο, έχει βρεθεί πως η SM ανταγωνίζεται άλλα φωσφολιπίδια για τη σύνδεση στο ενεργό κέντρο της LCAT, και έτσι αναστέλλει τη δραστηριότητα της και οδηγεί σε μειωμένη εστεροποίηση της χοληστερόλης. (128)

Τέλος, το προφίλ των λιπαρών οξέων της HDL των ασθενών με NAFLD παρουσιάζει στο σύνολο του σημαντικές ομοιότητες με αυτό των ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που βρέθηκαν αυξημένα στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος φαίνεται πως αυξάνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, ενώ τα πολυακόρεστα όπως το εικοσαπεντανοϊκό οξύ και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ, τα οποία μειώθηκαν στο μόριο της HDL λιποπρωτεΐνης φαίνεται να έχουν ευεργετικές επιδράσεις και να μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. (72) Πιο συγκεκριμένα, από κλινικές μελέτες και πειραματικά μοντέλα έχει παρατηρηθεί πως η λειτουργία του ενδοθηλίου επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από τα λιπαρά οξέα. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα επάγουν προφλεγμονώδεις διεργασίες, αυξάνουν τη βλάβη του ενδοθηλίου και επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα επιδιόρθωσης του, ενώ τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βελτιώνουν σε σημαντικό βαθμό τη λειτουργία του. Επιπλέον, η αντιφλεγμονώδης δράση των HDL σωματιδίων αυξάνεται μετά την κατανάλωση πολυακόρεστων και μειώνεται μετά την κατανάλωση αυξημένης ποσότητας κορεσμένων λιπαρών οξέων. (129)

## 7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Η λιπιδική σύσταση της HDL λιποπρωτεΐνης των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος παρουσιάζει σημαντικές διαφορές κυρίως στη σύσταση των γλυκεροφωσfolιπιδίων, των σφιγγολιπιδίων και των λιπαρών οξέων σε σχέση με αυτή των υγιών ασθενών. Οι διαφορές που παρατηρούνται πιθανά αντανακλούν τις διαταραχές στο μεταβολισμό των λιπιδίων που έχουν παρατηρηθεί ότι συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της νόσου και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες διάγνωσης και εξέλιξης της νόσου. Επιπλέον, οι μεταβολές στην περιεκτικότητα των φωσfolιπιδίων αλλά και το διαφορετικό προφίλ των λιπαρών οξέων της HDL λιποπρωτεΐνης που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο των ασθενών αυτών.



## 8 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

**ΣΚΟΠΟΣ:** Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) είναι η πιο συχνή χρόνια ηπατική νόσος και η συχνότητά της αναμένεται να αυξηθεί στο μέλλον. Μέχρι και σήμερα δεν έχει βρεθεί ένας ειδικός και ευαίσθητος βιοδείκτης διάγνωσης και εξέλιξης της νόσου, ενώ πρόσφατα η NAFLD προτάθηκε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου εκδήλωσης της Καρδιαγγειακής Νόσου (CHD). Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση του λιπιδικού προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με NAFLD, με στόχο την ανάδειξη βιοδεικτών διάγνωσης και την εξήγηση του αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου που παρουσιάζουν οι εν λόγω ασθενείς.

**ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ:** Μελετήθηκε με φασματοσκοπία NMR η λιπιδική σύσταση των HDL σωματιδίων 20 ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο ήπατος (υπερηχογραφικά επιβεβαιωμένη), 20 ασθενών με εγκατεστημένη Καρδιαγγειακή Νόσο και 20 υγιών εθελοντών.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Οι ασθενείς με NAFLD εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σφιγγολιπιδίων, κυρίως κεραμιδίων και μειωμένες συγκεντρώσεις φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις του αραχιδονικού οξέος, του εικοσαπεντανοϊκού οξέος και του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος ήταν μειωμένες στους ασθενείς με NAFLD αλλά και στους ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στο σύνολο οι μεταβολές των συγκεντρώσεων που παρατηρήθηκαν ήταν όμοιες και στις δύο ομάδες ασθενών, με εξαίρεση τη συγκέντρωση των κεραμιδίων που ήταν αυξημένη στους ασθενείς με NAFLD και μειωμένη στους ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και τη συγκέντρωση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης που ήταν μειωμένη στους ασθενείς με NAFLD και αυξημένη στους ασθενείς με CHD.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Οι διαφορές, που παρατηρήθηκαν στη λιπιδική σύσταση της HDL λιποπρωτεΐνης των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος σε σχέση με των υγιών, αντανακλούν τις διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων που συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της NAFLD και μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες διάγνωσης και εξέλιξής της. Ακόμη, οι διαφορές αυτές ενδέχεται να επηρεάζουν τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της HDL λιποπρωτεΐνης και να εξηγούν εν μέρει τον αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου που παρουσιάζουν οι ασθενείς με NAFLD.

## 9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017;9(16):715-32.
2. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999;116(6):1413-9.
3. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129(1):113-21.
4. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology.* 2015;61(5):1547-54.
5. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* 2012;56(6):1384-91.
6. Zezos P, Renner EL. Liver transplantation and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(42):15532-8.
7. Lonardo A, Sookoian S, Pirola CJ, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism.* 2016;65(8):1136-50.
8. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):686-90.
9. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology.* 2005;42(1):44-52.
10. 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;64(1):73-84.
11. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):11-20.
12. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S47-64.
13. Kanwar P, Kowdley KV. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):225-43.
14. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology.* 2005;42(1):44-52.
15. Lonardo A, Bellentani S, Argo CK, Ballestri S, Byrne CD, Caldwell SH, et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis.* 2015;47(12):997-1006.
16. Fruci B, Giuliano S, Mazza A, Malaguarnera R, Belfiore A. Nonalcoholic Fatty liver: a possible new target for type 2 diabetes prevention and treatment. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):22933-66.
17. Nseir W, Shalata A, Marmor A, Assy N. Mechanisms linking nonalcoholic fatty liver disease with coronary artery disease. *Dig Dis Sci.* 2011;56(12):3439-49.
18. Norris AL, Steinberger J, Steffen LM, Metzger AM, Schwarzenberg SJ, Kelly AS. Circulating oxidized LDL and inflammation in extreme pediatric obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(7):1415-9.
19. Kantartzis K, Rittig K, Cegan A, Machann J, Schick F, Balletshofer B, et al. Fatty liver is independently associated with alterations in circulating HDL2 and HDL3 subfractions. *Diabetes Care.* 2008;31(2):366-8.
20. Benedict M.; Zhang, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017, 9, 715–732
21. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics.* 2006;118(4):1388-93
22. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):221-35.
23. York LW, Puthalapattu S, Wu GY. Nonalcoholic fatty liver disease and low-carbohydrate diets. *Annu Rev Nutr.* 2009;29:365-79.

24. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2008;48(6):993-9.
25. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013;59(1):138-43.
26. Mehal WZ. The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):637-44.
27. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1513-24.
28. Hamabe A, Uto H, Imamura Y, Kusano K, Mawatari S, Kumagai K, et al. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. *J Gastroenterol.* 2011;46(6):769-78.
29. Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2012;57(1):157-66.
30. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40(12):1461-5.
31. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;51(4):1209-17.
32. Smagris E, BasuRay S, Li J, Huang Y, Lai KM, Gromada J, et al. Pnpla3I148M knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology.* 2015;61(1):108-18.
33. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2014;46(4):352-6.
34. Holmen OL, Zhang H, Fan Y, Hovelson DH, Schmidt EM, Zhou W, et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. *Nat Genet.* 2014;46(4):345-51.
35. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016;65(8):1038-48.
36. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):370-9.
37. 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(5):1343-51.
38. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia.* 2005;48(4):634-42.
39. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM.* 2010;103(2):71-83.
40. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, Katayama M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr.* 2012;4(1):32.
41. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(6):349-64.
42. Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res.* 2013;52(1):165-74.
43. Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes.* 2006;55(6):1554-61.
44. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology.* 2004;40(1):46-54.
45. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology.* 2008;48(3):792-8.

46. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57.
47. Lee SS, Park SH, Kim HJ, Kim SY, Kim MY, Kim DY, et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol*. 2010;52(4):579-85.
48. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2014;28(11):607-18.
49. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratziu V, et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(10):1209-22.
50. Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):666-75
51. Alkhoury N, McCullough AJ. Noninvasive Diagnosis of NASH and Liver Fibrosis Within the Spectrum of NAFLD. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2012;8(10):661-8.
52. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(8):1497-502.
53. Alkhoury N, Berk M, Yerian L, Lopez R, Chung YM, Zhang R, et al. OxNASH score correlates with histologic features and severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2014;59(7):1617-24.
54. Sud M, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D527-32.
55. Oresic M, Hänninen VA, Vidal-Puig A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends Biotechnol*. 2008;26(12):647-52.
56. Sandra K, Sandra P. Lipidomics from an analytical perspective. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(5):847-53.
57. Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res*. 2003;44(6):1071-9.
58. Watson AD. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res*. 2006;47(10):2101-11.
59. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(7):594-610.
60. Chin Chye Teo WPKC, Eddy Tan, Nurhidayah Binte Basri, Zhen Jie Low, Ying Swan Ho Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015;66:1-18.
61. Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*. 2004;306(5695):471-3.
62. Arnold von Eckardstein DK. High Density Lipoproteins From Biological Understanding to Clinical Exploitation: Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London.
63. DE LALLA OF, GOFMAN JW. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Methods Biochem Anal*. 1954;1:459-78.
64. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1986;128:417-31.
65. Barrans A, Jaspard B, Barbaras R, Chap H, Perret B, Collet X. Pre-beta HDL: structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1300(2):73-85.
66. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res*. 2013;54(11):2950-63.
67. Boes E, Coassin S, Kollerits B, Heid IM, Kronenberg F. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review. *Exp Gerontol*. 2009;44(3):136-60.
68. Pérez-Méndez Ó, Pacheco HG, Martínez-Sánchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clin Chim Acta*. 2014;429:111-22.
69. Kosmas CE, Christodoulidis G, Cheng JW, Vittorio TJ, Lerakis S. High-density lipoprotein functionality in coronary artery disease. *Am J Med Sci*. 2014;347(6):504-8.
70. Sviridov D, Mukhamedova N, Remaley AT, Chin-Dusting J, Nestel P. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. *J Atheroscler Thromb*. 2008;15(2):52-62.

71. Kon V, Ikizler TA, Fazio S. Importance of high-density lipoprotein quality: evidence from chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22(3):259-65.
72. Kostara CE, Papatheanasiou A, Psychogios N, Cung MT, Elisaf MS, Goudevenos J, et al. NMR-based lipidomic analysis of blood lipoproteins differentiates the progression of coronary heart disease. *J Proteome Res.* 2014;13(5):2585-98.
73. Morgantini C, Meriwether D, Baldi S, Venturi E, Pinnola S, Wagner AC, et al. HDL lipid composition is profoundly altered in patients with type 2 diabetes and atherosclerotic vascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(6):594-9.
74. Holzer M, Wolf P, Curcic S, Birner-Gruenberger R, Weger W, Inzinger M, et al. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res.* 2012;53(8):1618-24.
75. Fournier N, Paul JL, Atger V, Cogny A, Soni T, de la Llera-Moya M, et al. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2685-91.
76. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, et al. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem.* 2000;275(47):36596-604.
77. Ferretti G, Bacchetti T, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis.* 2006;184(1):1-7.
78. de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis.* 2012;222(2):390-4.
79. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2009;50(6):1827-38.
80. Gorden DL, Myers DS, Ivanova PT, Fahy E, Maurya MR, Gupta S, et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J Lipid Res.* 2015;56(3):722-36.
81. Anjani K, Lhomme M, Sokolovska N, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Bouillot JL, et al. Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J Hepatol.* 2015;62(4):905-12.
82. Muir K, Hazim A, He Y, Peyressatre M, Kim DY, Song X, et al. Proteomic and lipidomic signatures of lipid metabolism in NASH-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(15):4722-31.
83. Patterson AD, Maurhofer O, Beyoglu D, Lanz C, Krausz KW, Pabst T, et al. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling. *Cancer Res.* 2011;71(21):6590-600.
84. Loomba R, Quehenberger O, Armando A, Dennis EA. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res.* 2015;56(1):185-92.
85. Amor AJ, Pinyol M, Solà E, Catalan M, Cofán M, Herreras Z, et al. Relationship between noninvasive scores of nonalcoholic fatty liver disease and nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities: A focus on atherogenic dyslipidemia. *J Clin Lipidol.* 2017;11(2):551-61.e7.
86. Burstein M, Samaille J. Selective precipitation beta blood lipoproteins by heparin and synthetic heparinoids in the presence of calcium chloride. *J Physiol (Paris)* 1957; 49: 83-86.
87. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
88. Park KH, Shin DG, Kim JR, Hong JH, Cho KH. The functional and compositional properties of lipoproteins are altered in patients with metabolic syndrome with increased cholesteryl ester transfer protein activity. *Int J Mol Med.* 2010;25(1):129-36.
89. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):4963-71.
90. Femlak M, Gluba-Brzózka A, Ciałkowska-Rysz A, Rysz J. The role and function of HDL in patients with diabetes mellitus and the related cardiovascular risk. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):207.
91. Fadaei R, Poustchi H, Meshkani R, Moradi N, Golmohammadi T, Merat S. Impaired HDL cholesterol efflux capacity in patients with non-alcoholic fatty liver disease is associated with subclinical atherosclerosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):11691

92. Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J Hepatol* 2008; 48: 300–307.
93. Ma DW, Arendt BM, Hillyer LM, Fung SK, McGilvray I, Guindi M, Allard JP. Plasma phospholipids and fatty acid composition differ between liver biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease and healthy subjects. *Nutr Diabetes*. 2016;6:e220
94. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007; 46:1081–1090.
95. Wattacheril J, Seeley EH, Angel P, Chen H, Bowen BP, Lanciault C, Caprioli RM, Abumrad N, Flynn CR. Differential intrahepatic phospholipid zonation in simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013;8:e57165.
96. Chiappini F, Coilly A, Kadar H, Gual P, Tran A, Desterke C, et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep*. 2017;7:44658.
97. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Investig.* 2005; 115: 1333–1342
98. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2006; 116:1052–1062
99. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, et al. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2007;282:25123–25130.
100. Singaraja RR, Van Eck M, Bissada N, et al.. Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation*. 2006; 114:1301–130
101. Cole LK, Vance JE, Vance DE . Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1821: 754–761.
102. M.E. Rinella, et al., Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet, *J. Lipid Res.*; 2008; 49: 1068–1076.
103. Walker, A. K. et al. A conserved SREBP-1/ phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell*; 2011; 147: 840–852
104. Albers, J.J., Vuletic, S., Cheung, M.C. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Bba-Mol Cell. Biol. L*. 2012;1821:345–357
105. Nass KJ, van den Berg EH, Gruppen EG, Dullaart RPF. Plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and phospholipid transfer protein activity independently associate with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(9):e12988
106. van der Veen JN, Lingrell S, Vance DE. 2012. The membrane lipid, phosphatidylcholine, is an unexpected source of triacylglycerol in the liver. *J Biol Chem* 287: 23418–23426
107. Meikle PJ, Summers SA. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:79–91.
108. Song, J. *et al.* Polymorphism of the *PEMT* gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J.*; 2005; 19:1266–1271.
109. Dong, H. *et al.* The phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population. *J. Hepatol.*; 2007; 46: 915–920.
1010. Law SH, Chan ML, Marathe GK, Parveen F, Chen CH, Ke LY. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1149.
1011. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G (2009) Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 50: 574–585.
1012. Liu, Z. et al. Association of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 with the Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Result from the APAC Study. *Scientific reports* 2018; 8 :10127
1013. Colak et al. Association of Serum Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Level with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2011 ; 10. 103-9. 10.1089/met.2011.0111.

114. Régnier M, Polizzi A, Guillou H, Loiseau N. Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie* ; 2019; 159:9–22.
115. Gorden DL, Ivanova PT, Myers DS, et al. Increased diacylglycerols characterize hepatic lipid changes in progression of human nonalcoholic fatty liver disease; comparison to a murine model. *PLoS one*. 2011;6:e2:2775.
116. Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(8):365–371
117. Holland WL, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med*. 2011; 17:55–63.
118. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev*. 2008; 29:381–402
119. Kasumov, T., L. Li, M. Li, K. Gulshan, J.P. Kirwan, X. Liu, S. Previs, B. Willard, J. D. Smith, and A. McCullough. 2015. Ceramide as a mediator of non-alcoholic Fatty liver disease and associated atherosclerosis. *PLoS One*. 10: e0126910
120. Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E. & Gambino, R. Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **155**, 282–302 e288
121. Walle P, Takkunen M, Männistö V, et al. Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity. *Metabolism* 2016;65:655–666.
122. Lamarche B, Uffelman KD, Carpentier A, Cohn JS, Steiner G, Barrett PH, et al. Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *J Clin Invest*. 1999;103(8):1191-9.
123. Skeggs JW, Morton RE. LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport. *J Lipid Res*. 2002;43(8):1264-74.
124. Kinoshita M, Fujita M, Usui S, Maeda Y, Kudo M, Hirota D, et al. Scavenger receptor type BI potentiates reverse cholesterol transport system by removing cholesterol ester from HDL. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):197-202.
125. Yetukuri L, Söderlund S, Koivuniemi A, Seppänen-Laakso T, Niemelä PS, Hyvönen M, Taskinen MR, Vattulainen I, Jauhiainen M, Oresic M. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res*. 2010; 51:2341–2351
126. Kostara, C. E.; Papathanasiou, A.; Cung, M. T.; Elisaf, M. S.; Goudevenos, J.; Bairaktari, E. T. Evaluation of Established Coronary Heart Disease on the Basis of HDL and Non-HDL NMR Lipid Profiling. *J. Proteome Res*. 2010, 9, 897–911.
127. Baker, P. W.; Rye, K. A.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A.; Barter, P. J. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J. Lipid Res*. 2000, 41, 1261–1267.
128. Rye K-A, Hime N, Barter PJ. The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1996; 271: 4243–4250.
129. Kostara, C.E.; Tsimihodimos, V.; Elisaf, M.S.; Bairaktari, E.T. NMR-Based Lipid Profiling of High Density Lipoprotein Particles in Healthy Subjects with Low, Normal, and Elevated HDL-Cholesterol. *J. Proteome Res*. 2017, 16, 1605–1616.