



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ
ΠΡΟΦΙΛ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ
ΔΙΗΘΗΣΗ ΗΠΑΤΟΣ**

ΚΑΡΤΣΩΛΗ ΣΟΦΙΑ

ΙΑΤΡΟΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ
ΠΡΟΦΙΛ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ
ΔΙΗΘΗΣΗ ΗΠΑΤΟΣ**

ΚΑΡΤΣΩΛΗ ΣΟΦΙΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202,
παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Καρτσώλη Σοφίας: 17-10-2018

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 876α/18-12-2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Χριστοδούλου Δημήτριος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσιμιχόδημος Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 04-02-2019

«Μελέτη του λιπιδαιμικού και μεταβολικού προφίλ ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση του ήπατος»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1123α/24-10-2024

1. Χριστοδούλου Δημήτριος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Τσιμιχόδημος Βασίλειος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κατσάνος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μηλιώνης Χαράλαμπος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Καλαμπόκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Λιανός Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 18-03-2025

Ιωάννινα 12-05-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

Αικατερίνη Λαγού

Στην οικογένεια μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Γαστρεντερολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του καθηγητού Γαστρεντερολογίας κ. Δημητρίου Χριστοδούλου. Με την ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτήν την προσπάθεια και βοήθησαν να την φέρω εις πέρας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Χριστοδούλου για την συνεχή καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπο μου. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα τόσο για τις πολύτιμες συμβουλές και για την στήριξη που μου προσέφερε αλλά και για την ξεχωριστή συμβολή στην εξέλιξή μου στο ερευνητικό πεδίο της Γαστρεντερολογίας και Ηπατολογίας. Με την βοήθειά του κατάφερα να ξεπεράσω τις δυσκολίες που αναπόφευκτα παρουσιάζονται κατά τη διάρκεια ενός διδακτορικού .

Εν συνεχεία θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κ. Ελένη Μπαϊρακτάρη για την πολύτιμη βοήθεια, την συμπαράσταση και την ουσιαστική συμμετοχή της στην ερευνητική διαδικασία.

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

Η συμβολή της Δρ. Χριστίνας Κωσταρά, Μεταδιδακτορικής Ερευνήτριας του Εργαστηρίου κλινικής Χημείας, ήταν καθοριστική και την ευχαριστώ θερμά για την άμεση και συνεχή συνεργασία και την έμπρακτη υποστήριξη. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Αικατερίνη Δήμου, διδάκτορα του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας για την πολύτιμη βοήθειά της στην ερευνητική διαδικασία και για την αμέριστη βοήθεια της κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη στην μητέρα μου Γιώτα και στον αδερφό μου Χάρη, για τη συνεχή υποστήριξη και την αδιάκοπη συμπαράστασή τους, ενώ ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον σύντροφό μου Μάριο αλλά και στις φίλες Ελευθερία Δεμερτζίδου και Ιωάννα Παπακίτσου που μου συμπαραστάθηκαν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο σε αυτή την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	12
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	15
1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	18
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	18
Παχυσαρκία	18
Μεταβολικό Σύνδρομο	19
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και αντίσταση στην ινσουλίνη.....	20
Δυσλιπιδαιμία	21
ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	21
Ηλικία και Φύλο	21
ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ	22
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	23
Δίαιτα	23
Σωματική δραστηριότητα και τρόπος ζωής.....	24
1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ	25
1.5 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	27
ΗΠΑΤΙΚΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	28
ΈΚΚΡΙΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	30
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΤΩΝ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ- Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ	
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ	31
ΦΛΕΓΜΟΝΗ/ΣΤΕΑΤΟΗΠΑΤΙΤΙΣ	32
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ- ΑΔΙΠΟΚΙΝΕΣ.....	33
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ.....	34
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ	35
1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	37
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	37
ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ	38
1.7 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ NAFLD -	
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	39
1.8 ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ	
ΤΗΣ NAFLD.....	40

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ NAFLD	40
ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ NASH. .41	
ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΙΝΩΣΗΣ .42	
2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙCS	44
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	44
2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙCS ΚΑΙ NAFLD.....	45
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	45
Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσού (Branched-chain amino acids, BCAAs).46	
Αρωματικά αμινοξέα (Aromatic Amino Acids, AAA)	47
Αμινοξέα και αντίσταση στην ινσουλίνη.....	48
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΣ ΤΡΙΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	50
ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ.....	50
ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗ ΚΑΙ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟ ΟΞΥ	52
3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ -	
LIPIDOMICS ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	54
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	54
3.2 LIPIDOMICS	57
3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	58
3.4 LIPIDOMICS ΚΑΙ NAFLD.....	60
ΓΛΥΚΕΡΟΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ	62
ΣΦΙΓΤΟΛΙΠΙΔΙΑ.....	66
ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΛΙΠΙΔΙΑ.....	68
ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	69
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΩΝ ΤΟΥ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ	72
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ LIPIDOMICS ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΤΗΣ NASH	73
4. ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (NUCLEAR MAGNETIC	
RESONANCE, NMR).....	75
ΘΕΩΡΙΑ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ	75
ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (NMR)	76

ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ (TARGETED) ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ (UNTARGETED)	
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	77
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ $^1\text{H-NMR}$	77
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	78
ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (MULTIVARIATE DATA ANALYSIS, MDA).....	78
5. ΣΚΟΠΟΣ.....	79
6. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
6.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	80
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	80
Εργαστηριακός εξοπλισμός και απαιτούμενα αντιδραστήρια	81
6.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	82
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	82
6.2.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΟΡΟΥ	82
ΔΙΗΘΗΣΗ ΥΠΟ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ (ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ) ΟΡΟΥ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	82
ΠΡΟΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΙΗΘΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ	
$^1\text{HNMR}$	84
6.2.2. ΛΙΠΙΔΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	84
ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ HDL	
ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	84
Εκχύλιση λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών	85
Προεργασία των εκχυλισμάτων των λιπιδίων της HDL για τη λήψη των	
φασμάτων $^1\text{H NMR}$	86
6.2.3. Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H NMR}$	87
6.2.4 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των λιπιδίων	87
6.2.5 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών μεταβολικού	
προφίλ του ορού.....	88
6.3 Στατιστική ανάλυση δεδομένων	88
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	90
7.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	90
ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	91

7.1.1 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (TARGETED ANALYSIS).....	91
7.1.2 ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (UNTARGETED ANALYSIS)	93
7.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	96
7.2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΟΜΑΔΕΣ	97
7.2.2 ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ NAFLD ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	100
7.2.3 ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ NAFLD ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΓΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ.....	100
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	102
8.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	102
8.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	109
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	116
10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	117
11. ABSTRACT	119
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	121

Συντμήσεις/ Abbreviations

¹ H-MRS	Proton magnetic resonance spectroscopy
3-HIB	3-Hydroxyisobutyrate
AA	Amino acids
AAA	Aromatic amino acid
ABCA1	ATP-binding cassette Subfamily A Member 1
ACC	Acetyl coenzyme A carboxylase
ACL	ATP citrate lyase
AGP	Alpha 1-acid glycoprotein
ALD	Alcoholic liver disease
apoA1	Apolipoprotein A1
apoB	Apolipoprotein B
ARFI	Acoustic radiation force impulse
ATGL	Adipose triglyceride lipase
BCAA	Branched-chain amino acid
CAP	Controlled attenuation parameter
CETP	Cholesterol ester transfer protein
CHD	Coronary heart disease
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CK18	Cytokeratin 18
CT	Computed tomography
CVD	Cardiovascular disease
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DG/DAG	Diacylglycerol
DGAT	Diacylglycerol acyl transferase
DNL	De novo lipogenesis
ELF	Enhanced liver fibrosis test
ELOVL6	Fatty acid elongase 6
ERS	Endoplasmic reticulum stress
FABPs	Fatty acid binding proteins
FADS1	Fatty acid desaturase 1
FATPs	Fatty acid transport proteins
FFA	Free fatty acids
FIB4	Fibrosis index based on four factors
FLI	Fatty liver index
FXR	Farnesoid X receptor
HDL	High density lipoprotein
HCC	Hepatocellular carcinoma
HFD	High-fat diet
HIS	Hepatic steatosis index
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance
HTGC	Hepatic triglyceride content
IL-6	Interleukin 6
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
LAP	Lipid accumulation product
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase
LCFA	Long-chain fatty acids
LDL	Low-density lipoprotein
LPC	Lysophosphatidylcholine
LpPLA2	Lipoprotein-associated phospholipase A2
LXRa	Liver X receptor a
MASLD	Metabolic-dysfunction-associated steatotic liver disease

MRE	Magnetic resonance elastography
MRI	Magnetic resonance imaging
MS	Metabolic syndrome
MTTP	Mitochondrial transfer protein
NAFL	Non-alcoholic fatty liver
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NMR	Nuclear magnetic resonance
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCA	Principal Component Analysis
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PEMT	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
PI	Phosphatidylinositol
PLA2	Phospholipase A2
PLP	Phospholipid transfer protein
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PS	Phosphatidylserine
PSCK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PPAR- α	Peroxisome proliferator-activated receptor- α
PUFA	Poly-unsaturated fatty acids
ROS	Reactive oxygen species
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SCD1	Stearyl-CoA desaturase 1
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase 1
SFA	Saturated fatty acids
SLD	Steatotic liver disease
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SPT	Serine palmitoyl-CoA transferase
SPMs	Specialized pro-resolving mediators
SREBP1c	Sterol regulatory element-binding protein 1c
SR-B1	Scavenger receptor B1
SNP	Single-nucleotide polymorphism
T2DM	Type 2 diabetes
TCA	Tricarboxylic acid
TGF- β	Transforming growth factor- β
TG	Triglycerides
TLR	Toll-like receptor
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2
TNF	Tumor necrosis factor
UPR	Unfolded protein response
VAI	Visceral adiposity index
VAT	Visceral adipose tissue
VCTE	Vibration controlled transient elastography
VLDL	Very low-density lipoprotein
VIP	Variable Importance for Projection
Δ ΜΣ	Δείκτης μάζας σώματος
HKK	Ηπατοκυτταρικός καρκίνος

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Διαγνωστικά κριτήρια μεταβολικού συνδρόμου.....	20
Πίνακας 2. Γονίδια που σχετίζονται με ανάπτυξη και πρόοδο της νόσου.....	26
Πίνακας 3. Μεταβολικά μονοπάτια που διαταράσσονται και αντίστοιχοι μεταβολίτες.....	53
Πίνακας 4. Κατηγορίες λιπιδίων.....	54
Πίνακας 5 Λιπιδικά συστατικά των HDL Λιποπρωτεϊνών.....	59
Πίνακας 6 Ευρήματα μελετών σε βιοψίες ήπατος ασθενών με NAFLD με Lipidomics.....	61
Πίνακας 7. Κύριες lipidomics μελέτες στον ορό/πλάσμα ασθενών με NAFLD	70
Πίνακας 8. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών.	90
Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις μεταβολιτών στον ορό του αίματος ασθενών με NAFLD σε σχέση με τους υγιείς.....	92
Πίνακας 10. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών.	96
Πίνακας 11. Λιπιδική Σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών στις κύριες κατηγορίες λιπιδίων..	97
Πίνακας 12. Σύσταση φωσφολιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών	98
Πίνακας 13. Προφίλ Λιπαρών Οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών	99

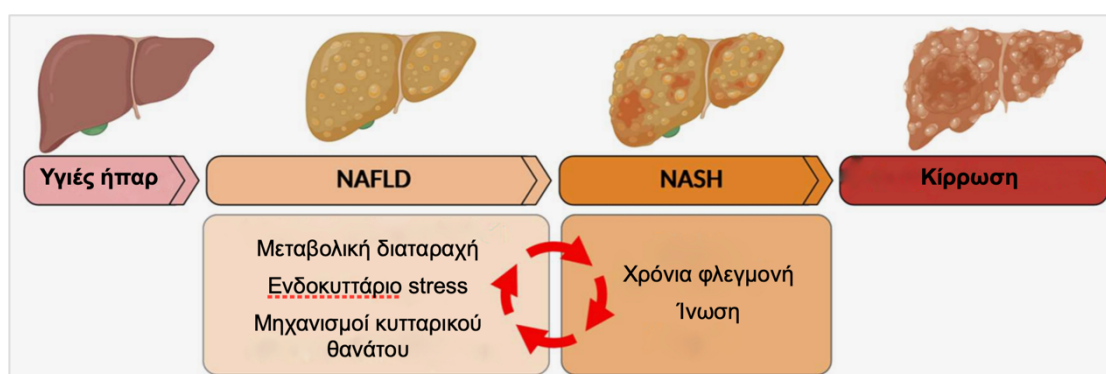
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Το φάσμα της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος.....	12
Εικόνα 2. Η SLD και οι υποκατηγορίες της.	14
Εικόνα 3. Γεωγραφικές διαφορές στον επιπολασμό της NAFLD παγκοσμίως.....	16
Εικόνα 4. Παράγοντες κινδύνου μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος.....	19
Εικόνα 5 De novo lipogenesis.....	29
Εικόνα 6 Εικόνα λιπαρών οξέων	55
Εικόνα 7 Εικόνα ενός γλυκεριδίου	55
Εικόνα 8: Το μόριο της ελεύθερης χοληστερόλης.....	56
Εικόνα 9: Μόριο-γλυκεροφωσfolιπιδίου και σφιγγολιπιδίου	56
Εικόνα 10 Φίλτρα Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices	83
Εικόνα 11 Βήματα διαδικασίας φιλτραρίσματος δείγματος ορού	83
Εικόνα 12 Σχηματική παράσταση των μεθόδων καταβύθισης.....	85
Εικόνα 13. Ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών PLS-DA που λήφθηκε για 62 ασθενείς με NAFLD και 43 υγιείς	94
Εικόνα 14 Δοκιμές αναδιάταξης- ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών PLS-DA.....	94
Εικόνα 15 Διαγράμματα συντελεστών VIP PLS-DA	94
Εικόνα 16. Φάσμα ^1H NMR εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών.....	98

1. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

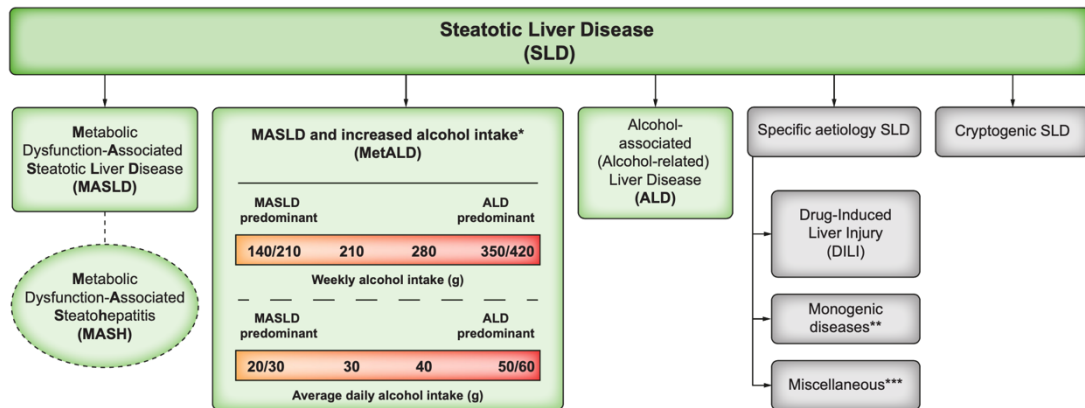
Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι μία από τις πιο συχνές αιτίες χρόνιας ηπατικής νόσου και ο επιπολασμός της αυξάνεται παγκοσμίως. Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ηπατικών διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ηπατικής στεάτωσης, χωρίς την ανεύρεση άλλων αιτιών στεάτωσης, όπως η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Η νόσος ποικίλλει από την απλή στεάτωση (non-alcoholic fatty liver: NAFL) μέχρι την πιο σοβαρή μορφή, την μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) (Εικόνα 1) [1]. Η απλή στεάτωση ή λιπώδες ήπαρ (NAFL) χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λίπους κυρίως με τη μορφή τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα σε ποσοστό >5% του παρεγχύματος, χωρίς ένδειξη ηπατοκυτταρικής βλάβης ή φλεγμονής. Αντίθετα, η NASH χαρακτηρίζεται από ηπατοκυτταρική βλάβη, φλεγμονή και απόπτωση στο έδαφος της στεάτωσης, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στην ίνωση και τελικά στην κίρρωση [1,2]. Αν και αρχικά η NAFL είχε θεωρηθεί μία εντελώς καλοήγη κατάσταση, μπορεί στην πραγματικότητα με την επίδραση μεταβολικών παραγόντων κινδύνου να εξελιχθεί σε NASH και σοβαρή ίνωση [3] .



Εικόνα 1. Το φάσμα της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. (Πηγή : Puengel et al nt. J. Mol. Sci. 2022, 23(5), 2668;

Η NAFLD αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες ηπατοκυτταρικού καρκίνου (hepatocellular carcinoma: HCC) και πιστεύεται ότι τα επόμενα χρόνια θα είναι η πρώτη αιτία ηπατικής ανεπάρκειας που οδηγεί σε μεταμόσχευση ήπατος στους ενήλικες [4,5]. Η πάθηση σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και άλλους μεταβολικούς παράγοντες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η κεντρική παχυσαρκία και η δυσλιπιδαιμία [6]. Τα τελευταία χρόνια, η NAFLD έχει αναδειχθεί ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (Cardiovascular Disease: CVD) και μάλιστα σχετίζεται με μελλοντικά συμβάντα, ανεξάρτητα από την ηλικία, το φύλο, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και το κάπνισμα [7,8]. Επιπλέον, η νοσηρότητα και η θνητότητα αυτών των ασθενών οφείλεται κυρίως στις καρδιαγγειακές επιπλοκές παρά στην ίδια την ηπατική νόσο [9,10]. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί εάν η NAFLD συμβάλλει ενεργά στην παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων ή αν τελικά η συσχέτισή της με την καρδιαγγειακή νόσο οφείλεται μόνο στους κοινούς παράγοντες κινδύνου.

Πρόσφατα, με την συμφωνία τριών διεθνών οργάνωσεων μελέτης των παθήσεων του ήπατος προτάθηκε η αλλαγή ονοματολογίας της λιπώδους διήθησης ήπατος [11]. Ως γενικός όρος που καλύπτει τις διάφορες αιτιολογίες της λιπώδους διήθησης προτάθηκε ο “Steatotic liver disease”. Αντίθετα, ο όρος “στεατοηπατίτιδα” θεωρήθηκε σημαντική παθοφυσιολογική έννοια που πρέπει να διατηρηθεί. Για την NAFLD προτάθηκε ο όρος MASLD: metabolic-dysfunction- associated steatotic liver disease και μάλιστα αποφασίστηκε και η αλλαγή του ορισμού που πλέον απαιτεί την παρουσία τουλάχιστον ενός από τους παράγοντες κινδύνου του μεταβολικού συνδρόμου. Στην περίπτωση που η λιπώδης διήθηση του ήπατος είναι άγνωστης αιτιολογίας και δεν συνυπάρχει τουλάχιστον μία μεταβολική παράμετρος αυτή ορίζεται ως κρυπτογενής (cryptogenic steatotic liver disease). Τα τελευταία χρόνια υπήρξε μία αυξανόμενη δυσaréσκεια για την ονομασία της πάθησης. Αρχικά, ο όρος “μη αλκοολική” θεωρήθηκε πως δεν αποτύπωνε σωστά την αιτιολογία της πάθησης ενώ ο όρος “fatty” παρέπεμπε στο στίγμα της παχυσαρκίας. Ακόμη, υπάρχει μία σημαντική κατηγορία των ατόμων με λιπώδες ήπαρ που παρουσιάζουν μεταβολικούς παράγοντες αλλά καταναλώνουν αλκοόλ σε ποσότητα που τους απέκλειε από τον προηγούμενο ορισμό, με αποτέλεσμα την αδυναμία ταξινόμησης τους σε NAFLD ή alcoholic liver disease (ALD) και τον αποκλεισμό από θεραπευτικές παρεμβάσεις.



Εικόνα 2. Η SLD και οι υποκατηγορίες της. (Πηγή: Rinella et al. J. Hepatol. 2023, 79, 1542–1556)[11]

Η αλλαγή της ονοματολογίας της πάθησης και συγκεκριμένα η αλλαγή των διαγνωστικών κριτηρίων μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικούς περιορισμούς όσον αφορά στην ανάπτυξη βιοδεικτών και θεραπευτικών επιλογών. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία αλλά και το ερευνητικό ενδιαφέρον είχε επικεντρωθεί στον προηγούμενο ορισμό και στα παλαιότερα κριτήρια, γεγονός που οδηγεί σε σύγχυση κατά την αξιολόγηση των ευρημάτων τους. Για την αποφυγή των παραπάνω προβλημάτων στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται ο όρος NAFLD και NASH, μιας και σχεδόν ολόκληρη η υπάρχουσα βιβλιογραφία χρησιμοποιεί αυτούς τους όρους.

Αν και τα τελευταία χρόνια η παθοφυσιολογία της νόσου έχει γίνει αντικείμενο εντατικής μελέτης, οι ακριβείς παθογενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα, δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τόσο η ποσότητα όσο και η ποιότητα των συσσωρευμένων λιπιδίων εμπλέκονται στην παθογένεση της NAFLD [12]. Μάλιστα, η συσσώρευση συγκεκριμένων λιπιδίων έχει βρεθεί πως οδηγεί σε κυτταρική βλάβη, κυτταρικό θάνατο και χρόνια φλεγμονή, διεργασία που ονομάζεται λιποτοξικότητα[12–14]. Ακόμη, οι μεταβολίτες που κυκλοφορούν αντανakλούν τις μεταβολικές διαταραχές που χαρακτηρίζουν την εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε NASH και συνεπώς η συνολική διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου [15].

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

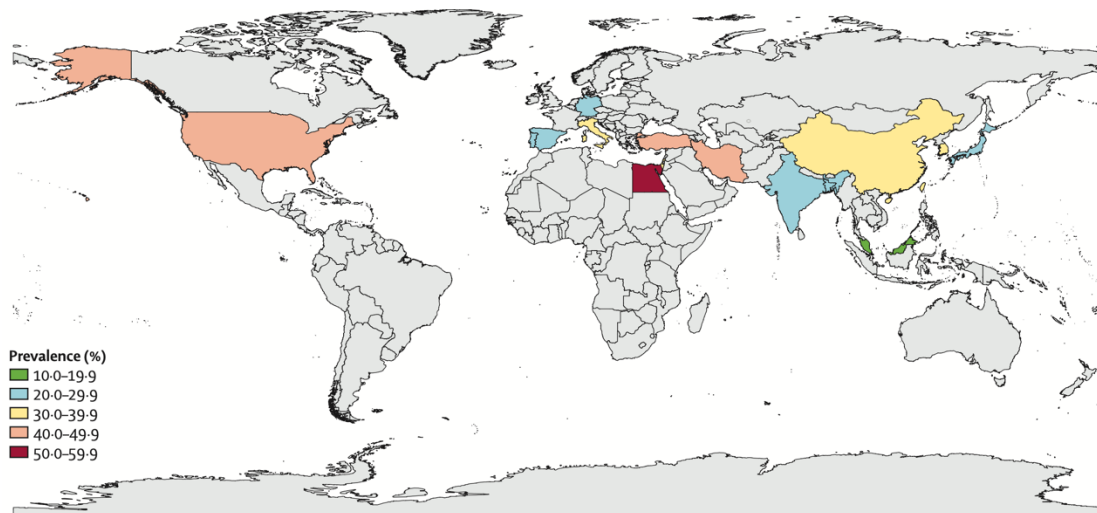
Ο επιπολασμός της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος στους ενήλικες εκτιμήθηκε στο 24-25% κατά την περίοδο 2016-2019 [6,16]. Ωστόσο, πιο πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες αναδεικνύουν μία σημαντική αύξηση στη συχνότητα της νόσου τα τελευταία χρόνια και αναφέρουν ποσοστά επιπολασμού που φτάνουν στο 32,4% [17]. Αυτή η ανοδική τάση έχει περιγραφεί και από άλλους μελετητές, οι οποίοι μεταξύ 2000 και 2015 παρατήρησαν αύξηση από το 20,1% στο 26,8% αντίστοιχα [6] και σε μία ακόμα πιο πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη ο επιπολασμός της νόσου αυξήθηκε από το 21.9% το 1991 στο ανησυχητικό 37.3% το 2019 [18].

Η 1^η γραμμής διαγνωστική μέθοδος, που προτείνεται για την απεικόνιση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος, είναι το υπερηχογράφημα [19]. Στην πλειονότητα των επιδημιολογικών μελετών η διάγνωση της νόσου πραγματοποιήθηκε με το υπερηχογράφημα άνω κοιλίας και με βάση αυτό ο συνολικός επιπολασμός υπολογίζεται στο 31%[20]. Ωστόσο, η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση της ηπατικής στεάτωσης είναι η βιοψία ήπατος, μία επεμβατική, ακριβή και σχετιζόμενη με επιπλοκές μέθοδος που την καθιστά ακατάλληλη για ευρεία χρήση σε επιδημιολογικές μελέτες [19]. Υψηλής διαγνωστικής ακρίβειας μέθοδος θεωρείται και η διάγνωση της ηπατικής στεάτωσης με MRI, η οποία επιτρέπει και την ποσοτική μέτρηση του κλάσματος λίπους αλλά έχει υψηλός κόστος και επί του παρόντος περιορισμένη χρήση [21]. Έτσι, η δεύτερη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδος στις επιδημιολογικές μελέτες ήταν η χρήση μη επεμβατικών τεστ, όπως το fatty liver index (FLI) και το hepatic steatosis index (HIS) [22]. Το FLI περιλαμβάνει την τιμή των τριγλυκεριδίων, BMI, γ-GT και την περίμετρο μέσης, ενώ το HIS τις τιμές των τρανσαμινασών, BMI, την παρουσία διαβήτη τύπου 2 και το γυναικείο φύλο [23,24]. Ο επιπολασμός της νόσου με τη χρήση αυτών των μη επεμβατικών δεικτών υπολογίζεται στο 25.6% [25]. Ωστόσο, αν και αποτελούν αποδεκτές εναλλακτικές για τη διάγνωση της στεάτωσης, υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί στη χρήση τους που αφορούν τόσο την ποσοτικοποίηση της στεάτωσης αλλά και τη διαγνωστική τους ακρίβεια. [17] Επιπλέον, από μελέτες συστηματικής ανασκόπησης έχει βρεθεί πως οι επιδημιολογικές αναφορές που βασίζονται σε αυτούς τους βιοδείκτες υποεκτιμούν τον επιπολασμό της NAFLD στο μισό περίπου από αυτές που βασίστηκαν σε μεθόδους απεικόνισης [6,26].

Σύμφωνα με πρόσφατη μετα-ανάλυση, η νόσος είναι συχνότερη στους άντρες από ότι στις γυναίκες, με επιπολασμό 39,7% και 25,6% αντίστοιχα. Μάλιστα, διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα διαπιστώνεται και στην επίπτωση της νόσου (70,8 περιπτώσεις ανά 1000 πρόσωπα-έτη για τους άνδρες έναντι 29,6 για τις γυναίκες). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί μία σταθερή αύξηση της συχνότητας της νόσου και στα δύο φύλα από το 2016 και μετά, η οποία φτάνει στο 44.5%

για τους άνδρες και στο 31.8% για τις γυναίκες. Αν και ένας μικρός αριθμός μελετών έχει αναφέρει επικράτηση της νόσου στις γυναίκες, θεωρείται πως το γυναικείο φύλο διαθέτει προστατευτικό μηχανισμό έναντι της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος [17].

Σε ό,τι αφορά τη γεωγραφική κατανομή της νόσου, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών περιοχών. Τα υψηλότερα ποσοστά έχουν καταγραφεί στη Βόρεια και Νότια Αμερική με επιπολασμό άνω του 35%, ακολουθεί η Ασία με επιπολασμό περίπου 30%, και τέλος η Αφρική με επιπολασμό 14-28%[25]. Στην Ευρώπη ο επιπολασμός ποικίλλει με βάση το διαγνωστικό μέσο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της νόσου. Ωστόσο μία πρόσφατη μετα-ανάλυση αναφέρει πως ο μέσος επιπολασμός στην Ευρώπη με βάση το υπερηχογράφημα είναι περίπου 27,2 %, ενώ από άλλους μελετητές φτάνει το 32,6%[17,27] (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Γεωγραφικές διαφορές στον επιπολασμό της NAFLD παγκοσμίως. (Πηγή: Riazi et al. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2022, 7, 851–861).[17]

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, ένα αξιόπιστο ποσοστό εμφάνισης της NASH είναι δύσκολο να αποδοθεί. 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 [28]. Επιπλέον, οι ασθενείς που θα οδηγηθούν τελικά σε βιοψία ήπατος επιλέγονται αυστηρά και δεν αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό της κοινότητας. Παρ' όλα αυτά τελικά εκτιμάται ότι έως και το 20% των ατόμων με NAFLD πλήττονται από τη NASH [29].

Επιπροσθέτως, με βάση τον αυξανόμενο επιπολασμό της παχυσαρκίας και του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, η συχνότητα της NAFLD αναμένεται να αυξηθεί και αυτή αναλογικά την

επόμενη δεκαετία [6]. Από το 1990 έως το 2017, οι θάνατοι λόγω κίρρωσης παγκοσμίως αυξήθηκαν από 899.000 σε 1,32 εκατομμύρια, ενώ τα έτη ζωής σε συνθήκες αναπηρίας αυξήθηκαν από 30,5 εκατομμύρια σε 41,4 εκατομμύρια. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, ο αριθμός των περιστατικών αντιρροπούμενης κίρρωσης λόγω NASH διπλασιάστηκε, ενώ για τη μη αντιρροπούμενη κίρρωση ο αριθμός τριπλασιάστηκε. Με τη βελτίωση των μέτρων πρόληψης και θεραπείας για την ηπατίτιδα Β και C, η NASH αναμένεται σύντομα να αποτελεί την πρώτη αιτία κίρρωσης [30].

Τα επιδημιολογικά δεδομένα για τη NAFLD στον παιδιατρικό πληθυσμό και στους εφήβους παρουσιάζουν μια πολύπλοκη εικόνα με μεγάλες διακυμάνσεις σε διάφορες μελέτες. Οι διαφορές στο σχεδιασμό των μελετών, η φυλετική ποικιλομορφία των υπό μελέτη πληθυσμών αλλά και τα διάφορα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της NAFLD, μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν την ετερογένεια των ευρημάτων. Ωστόσο, σύμφωνα με μετα-ανάλυση του 2015 ο συνολικός επιπολασμός της NAFLD σε παιδιά ηλικίας 1-19 ετών εκτιμάται στο 7,6% [31]. Εντούτοις, ο επιπολασμός σε παιδιατρικούς παχύσαρκους ασθενείς αυξάνεται σημαντικά, φθάνοντας το ποσοστό του 34,2% [31]. Επιπλέον, τα τελευταία τριάντα χρόνια, παρατηρείται μία ανησυχητική ανοδική τάση της συχνότητας εμφάνισης της NAFLD στα παιδιά, με ετήσια αύξηση που εκτιμάται στο 1,35% [32]. Αυτά τα επιδημιολογικά δεδομένα υπογραμμίζουν την επείγουσα ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τη φυσική ιστορία, την παθοφυσιολογία, τους γενετικούς παράγοντες και τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της NAFLD στον παιδιατρικό πληθυσμό.

1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Μεταβολικοί παράγοντες

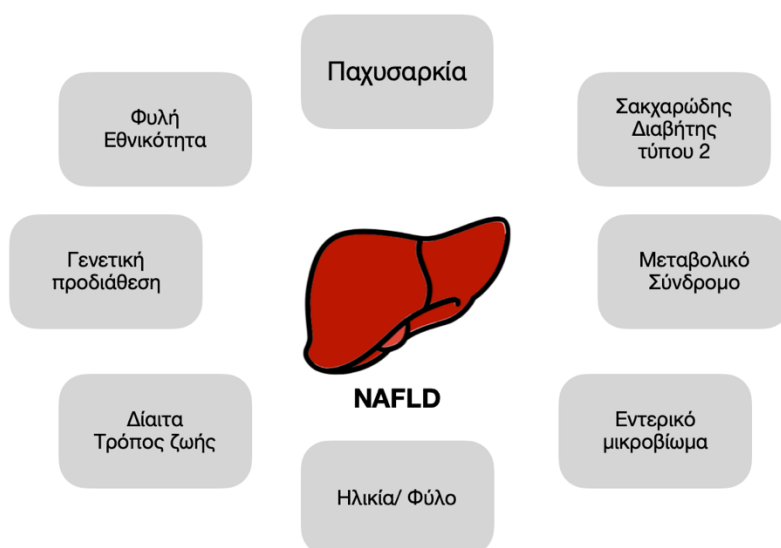
Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος και η συχνότητα εμφάνισης της αυξάνεται όσο αυξάνεται ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) [33]. Σύμφωνα με μία πρόσφατη μετα-ανάλυση η συχνότητα εμφάνισης της NAFLD ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα των νοσηρά παχύσαρκων ατόμων (78,09%), σε σύγκριση με την ομάδα των υπέρβαρων ή απλά παχύσαρκων ατόμων (52,65%), ενώ μόλις το 12,01% των μη παχύσαρκων ατόμων παρουσίαζε τη νόσο [26]. Ο επιπολασμός της νόσου στα παχύσαρκα άτομα κυμαίνεται στο 50%-90% και στους ασθενείς με NAFLD η παχυσαρκία ανευρίσκεται στο 51% [34,35]. Επιπλέον, τόσο ο αυξημένος ΔΜΣ όσο και η αυξημένη περίμετρος μέσης σχετίζονται στενά με την εκδήλωση της NAFLD αλλά και την εξέλιξη της νόσου [33]. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η NASH διαγιγνώσκεται στο έως και 80% των νοσηρά παχύσαρκων ασθενών, που υποβάλλονται σε λαπαροσκοπική βariatρική επέμβαση και αυτό υποδηλώνει τη στενή παθογενετική σχέση των δύο διαταραχών [36].

Η κοιλιακή παχυσαρκία σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και ακολούθως με αυξημένη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ [37]. Επιπλέον, στην περίπτωση της κοιλιακής παχυσαρκίας η δυσλειτουργία του σπλαχνικού λίπους έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση TNF και αδιποκινών όπως λεπτίνη και αδιποκίνη, οι οποίες συνεισφέρουν στην πρόοδο της νόσου σε στεατοηπατίτιδα, κίρρωση και ΗΚΚ [38].

Ωστόσο, παρά τη στενή παραπάνω συσχέτιση, ένα ποσοστό ασθενών με NAFLD έχουν ΔΜΣ εντός φυσιολογικών ορίων και αντιπροσωπεύουν την μη παχύσαρκτη NAFLD ή αλλιώς “lean” NAFLD. Ο επιπολασμός της NAFLD σε μη παχύσαρκα άτομα αντιστοιχεί στο 5-10% της νόσου [39]. Η συχνότητα εμφάνισης της “lean” NAFLD είναι ιδιαίτερα σημαντική στις αγροτικές περιοχές της Ασίας, όπου τα ποσοστά φτάνουν έως και 30% σε σύγκριση με το 7% των Αμερικανών [16]. Στους Ασιατικούς πληθυσμούς αυτά τα ευρήματα οφείλονται πιθανώς στα υψηλά ποσοστά κοιλιακής παχυσαρκίας με σωματικό βάρος όμως εντός των φυσιολογικών ορίων [40]. Παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της μη παχύσαρκης NAFLD περιλαμβάνουν γενετικούς παράγοντες, την κοιλιακή παχυσαρκία, την υψηλή πρόσληψη φρουκτόζης αλλά και την αύξηση του σωματικού βάρους ακόμη και εντός των φυσιολογικών

ορίων του ΔΜΣ [40]. Γενικά, οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν διαταραχές του μεταβολισμού που σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, αλλά παρουσιάζουν μικρότερη περίμετρο μέσης και χαμηλότερα ποσοστά μεταβολικού συνδρόμου, σε σχέση με τους παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD[41].



Εικόνα 4. Παράγοντες κινδύνου μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος

Μεταβολικό Σύνδρομο

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος θεωρείται αναπόσπαστο μέρος του μεταβολικού συνδρόμου (MS) με την αντίσταση στην ινσουλίνη να αποτελεί κεντρικό παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό [42]. Το μεταβολικό σύνδρομο περιλαμβάνει την κοιλιακή παχυσαρκία, την υπερτριγλυκεριδαίμια, τη χαμηλή HDL χοληστερόλη, την υπεργλυκαιμία και την υψηλή αρτηριακή πίεση [43]. Τα κριτήρια του συνδρόμου απεικονίζονται στον Πίνακα 1. Όλα τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου σχετίζονται στενά με τη NAFLD, και σύμφωνα με πλήθος μελετών η NAFLD αναγνωρίζεται πλέον ως η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου [44]. Άλλωστε, σύμφωνα με το νέο ορισμό της πάθησης, απαιτείται η παρουσία τουλάχιστον ενός κριτηρίου του μεταβολικού συνδρόμου [11].

Ο επιπολασμός της NAFLD είναι τετραπλάσιος στους ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια για μεταβολικό σύνδρομο σε σύγκριση με τα άτομα που δεν τα πληρούν [45]. Μάλιστα, μελέτες έχουν αναδείξει πως, όσο αυξάνεται ο αριθμός των διαγνωστικών κριτηρίων του MS, τόσο αυξάνεται και η επίπτωση της νόσου αλλά και η πιθανότητα εκδήλωσης σοβαρότερης μορφής της [43]. Έχει παρατηρηθεί μία αμφίδρομη συσχέτιση μεταξύ NAFLD και

χαρακτηριστικών MS ειδικά σε ότι αφορά το διαβήτη και την υπέρταση, καθώς το MS αυξάνει τον κίνδυνο NAFLD, ενώ η θεραπεία της NAFLD και της NASH μπορεί να βελτιώσει ορισμένα από τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου [46]. Επιπλέον, το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάντα και αυξάνει με αυτό τον τρόπο τη θνητότητα στους ασθενείς με NAFLD [47].

Πίνακας 1. Διαγνωστικά κριτήρια μεταβολικού συνδρόμου

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 πίεση 85 mm Hg ή μεγαλύτερη
5. Γλυκόζη νηστείας 110 mg/dL ή μεγαλύτερη.

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και αντίσταση στην ινσουλίνη

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την πρόοδο της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. Πλήθος πληθυσμιακών μελετών αναφέρουν ότι η συχνότητα της NAFLD είναι υψηλότερη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, και κυμαίνεται από 30% έως 70% [48]. Σύμφωνα με μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση ο συνολικός επιπολασμός της NAFLD μεταξύ των διαβητικών ασθενών ήταν 55,5% [48]. Επιπλέον, οι διαβητικοί ασθενείς διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο να παρουσιάσουν στεατοηπατίτιδα και επιπλοκές σχετιζόμενες με το ήπαρ συμπεριλαμβανομένου της κίρρωσης[49]. Ακόμη, η θνητότητα που σχετίζεται με επιπλοκές της NAFLD είναι 3-5 φορές μεγαλύτερη στους διαβητικούς ασθενείς σε σύγκριση με τα άτομα που δεν πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 [50].

Η αντίσταση στην ινσουλίνη που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς επάγει τη λιπόλυση από το λιπώδη ιστό, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων και την εναπόθεσή τους στο ήπαρ. Η ατελής μιτοχονδριακή οξείδωση των λιπαρών οξέων, η αυξημένη λιπογένεση και τα χαμηλά επίπεδα αδιπνονεκτίνης αποτελούν επιπλέον παθογενετικούς μηχανισμούς της αντίστασης στην ινσουλίνη που συνεισφέρουν στην εκδήλωση της NAFLD [38,51].

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, ενώ η μία πάθηση φαίνεται να επηρεάζει την άλλη [52]. Η συχνότητα του διαβήτη είναι σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, και η επίπτωση και ο επιπολασμός του διαβήτη αυξάνεται όσο προχωρεί η ηπατική ίνωση[53].

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. Επιπλέον, σε ό,τι αφορά συνολικά τα λιπίδια, οι ασθενείς με NAFLD έχουν υψηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων, λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και κεραμιδίων, ενώ στο ήπαρ παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα χολικών οξέων και ελεύθερης χοληστερόλης [54]. Μάλιστα, η υπερτριγλυκεριδαιμία αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της NAFLD και επιπρόσθετα αυξάνει τον κίνδυνο κίρρωσης [55]. Η εκδήλωση στεατοηπατίτιδας σχετίζεται με υψηλά επίπεδα non-HDL χοληστερόλης. Τα ηπατοκύτταρα παράγουν το ένζυμο PCSK9, το οποίο συνδεόμενο στον υποδοχέα της LDL χοληστερόλης εμποδίζει την απομάκρυνσή της διαμέσου αυτών. Τα επίπεδα του PCSK9 σχετίζονται με το βαθμό της στεάτωσης και αυξάνονται με τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ [56]. Ο σημαντικός ρόλος των λιπιδίων στην πάθηση έχει φανεί και από την ευεργετική επίδραση στα ιστολογικά χαρακτηριστικά της NASH που έχουν τα φάρμακα μείωσης των λιπιδίων. Οι στατίνες μειώνουν την πρόοδο της ηπατικής ίνωσης, την πιθανότητα ρήξης της αντιρρόπησης στην κίρρωση και τον κίνδυνο θανάτου από όλες τις αιτίες σε ασθενείς με χρόνια νοσήματα του ήπατος [57]. Έχει αναφερθεί επίσης ότι διαθέτουν αντικαρκινικές ιδιότητες και μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος [58].

Δημογραφικοί παράγοντες

Ηλικία και Φύλο

Αν και η ηλικία δεν αποτελεί εμπόδιο για την ανάπτυξη της NAFLD, η συχνότητα της NAFLD αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας [6]. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την αύξηση του επιπολασμού των παραγόντων κινδύνου, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και η υπέρταση που παρατηρείται στα άτομα με προχωρημένη ηλικία[59].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο επιπολασμός της νόσου είναι συνήθως υψηλότερος στους άνδρες από ότι στις γυναίκες. Η συχνότητα εκδήλωσης της NAFLD στους άνδρες τείνει να αυξάνεται στα άτομα μέσης ηλικίας και ακολούθως μειώνεται μετά την ηλικία των 50 ετών. Αντίθετα, στις γυναίκες ο επιπολασμός είναι χαμηλότερος πριν από την ηλικία των 50 ετών και αυξάνεται μετά την εμμηνόπαυση, φτάνοντας στο μέγιστο στην ηλικία των 60 ετών[60].

Σε ό,τι αφορά το στάδιο και την πρόοδο της νόσου, οι άνδρες έχουν υψηλότερο κίνδυνο προχωρημένης ηπατικής ίνωσης σε σύγκριση με τις προ εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ωστόσο, οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν παρόμοιο κίνδυνο προχωρημένης ίνωσης όπως και οι άνδρες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η σύγκριση αυτή δεν έγινε σε παρόμοια ηλικιακά όρια, καθώς οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είχαν κατά μέσο όρο μεγαλύτερη ηλικία (56 ± 7 έτη) σε σχέση με τους άνδρες (46 ± 12 έτη) και τις προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (40 ± 8 έτη) [61]. Επιπλέον, η προχωρημένη ηλικία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για πιο προχωρημένη ίνωση σε ασθενείς με NASH [62].

Εντερικό μικροβίωμα

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται μεγάλη προσπάθεια κατανόησης του ρόλου του εντερικού μικροβιώματος στη φυσιολογία και την παθοφυσιολογία πλήθους παθήσεων. Ο όρος εντερικό μικροβίωμα περιγράφει το σύνολο του γενετικού και μεταβολικού περιεχομένου της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας (microbiota) και ως δυσβίωση ορίζεται η διαταραχή στην ισορροπία αυτής της χλωρίδας [63]. Το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα αποτελείται από 10 έως 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια και υπόκειται σε πλήθος περιβαλλοντικών και παθοφυσιολογικών μεταβολών [64].

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 [65]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το εντερικό μικροβίωμα επηρεάζει τον ηπατικό μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων και επιδρά στην ισορροπία μεταξύ προφλεγμονώδων και αντιφλεγμονωδών παραγόντων στο ήπαρ [66]. 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 στην πυλαία κυκλοφορία, ενεργοποιώντας τη φλεγμονή στο ηπατικό παρέγχυμα [63].

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 ΔΜΣ [63]. Ο αυξημένος αριθμός ορισμένων βακτηριακών ειδών όπως *Proteobacteria* και *Bacteroides* σχετίζονται με το λιπώδες ήπαρ, και μάλιστα είναι ακόμα μεγαλύτερος σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με τους υγιείς [67,68]. Ακόμη, κατά την πρόοδο της νόσου, έχει παρατηρηθεί μία αύξηση σε *Proteobacteria* και μείωση σε *Firmicutes*, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το εντερικό μικροβίωμα δεν παραμένει σταθερό κατά την εξέλιξη της νόσου [68].

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Δίαιτα

Ορισμένοι διατροφικοί παράγοντες έχει φανεί πως συμβάλλουν σε σημαντικό βαθμό στην εμφάνιση της NAFLD. Η φρουκτόζη, είτε προερχόμενη από σουκρόζη είτε από σιρόπι καλαμποκιού, συμβάλλει όχι μόνο στην ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης αλλά και στην εξέλιξη σε NASH [69]. Τα σάκχαρα επάγουν την de novo λιπογένεση και ενεργοποιούν μια φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί στην απόπτωση των ηπατοκυττάρων μέσω c-Jun-N-Terminal μονοπατιού [70].

Οι ασθενείς με NAFLD αρκετά συχνά ακολουθούν 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 [71]. Τα ω-3 λιπαρά οξέα συγκεκριμένα έχει φανεί πως μειώνουν την ηπατική συσσώρευση λίπους στους ασθενείς αυτούς [72]. Γενικά, η διατροφή δυτικού τύπου, που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, επεξεργασμένων δημητριακών, γλυκών και αναψυκτικών με γλυκαντικές ουσίες, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης 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 η πιο αποτελεσματική και κοινά αποδεκτή υγειονομολογική παρέμβαση στη NAFLD [73].

Σωματική δραστηριότητα και τρόπος ζωής

Σε ό,τι 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 [74]. Η άσκηση μπορεί να επηρεάσει τόσο την ευαισθησία στην ινσουλίνη όσο και τα κυκλοφορούντα επίπεδα αδιπνονεκτίνης, και με αυτούς τους τρόπους εμμέσως τη συσσώρευση λίπους στο ηπατικό παρέγχυμα[75]. Μάλιστα, η φυσική άσκηση αποτελεί μέρος των υγιεινοδιαιτητικών παρεμβάσεων για την αντιμετώπιση της νόσου [76].

Το κάπνισμα έχει αναγνωριστεί ως ένας επιπλέον ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της NAFLD σύμφωνα με μία αναδρομική μελέτη με δείγμα 2029 συμμετέχοντες [77]. Μάλιστα, η σύσταση διακοπής καπνίσματος σε ασθενείς με NAFLD δεν έχει μόνο ως στόχο την μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου αλλά και την πρόληψη εξέλιξης της νόσου σε πιο προχωρημένα στάδια [78].

Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η κακή ποιότητα ύπνου και οι διαταραχές του ύπνου σχετίζονται με την παχυσαρκία η οποία συνεισφέρει στην παθογένεια της NAFLD. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η αύξηση φλεγμονωδών παραγόντων όπως η ιντερλευκίνη 6 και ο TNF-α, που παρατηρείται σε διαταραχές ύπνου. Αυτοί οι παράγοντες επάγουν τη λιπόλυση, η οποία, στη συνέχεια, οδηγεί σε συσσώρευση λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Επιπλέον, η έλλειψη ύπνου μπορεί να επηρεάσει τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-κορτιζόλης και τον μεταβολισμό της κορτιζόλης, με επακόλουθο την περαιτέρω αποθήκευση λίπους στο ήπαρ [60]. Το σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας ύπνου συγκεκριμένα έχει ενοχοποιηθεί για την εξέλιξη της NAFLD από απλή στεάτωση σε NASH [74].

Τέλος, αν και η ατμοσφαιρική ρύπανση δεν έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου της NAFLD από την πλειοψηφία των ερευνητών, υπάρχει πιθανότητα να συμβάλει και αυτή στην παθογένεια με διάφορους τρόπους. Μελέτες δείχνουν ότι η μακροχρόνια έκθεση σε σωματίδια PM_{2.5} μπορεί να επάγει τη φλεγμονή στο ήπαρ, με επακόλουθα τις οξειδωτικές βλάβες στο DNA και την έκκριση κυτταροκινών. Ακόμη, τα σωματίδια PM_{2.5} πιθανά επηρεάζουν την ηπατική απόκριση στην ινσουλίνη είτε με άμεση επίδραση στη δομή και λειτουργία βιολογικών μακρομορίων (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες) είτε έμμεσα μέσω της ενεργοποίησης ενδοκυττάρων οξειδωτικών μονοπατιών. Παρά τα αποτελέσματα σχετικά με τις φλεγμονώδεις και οξειδωτικές ιδιότητες των ατμοσφαιρικών ρύπων, ο ακριβής ρόλος τους στην παθοφυσιολογία της NAFLD παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση [79].

1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

Η γεωγραφική κατανομή, η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε οικογένειες αλλά και οι μελέτες σε δίδυμους οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η εμφάνιση της NAFLD σχετίζεται και με γενετικούς παράγοντες. Επιπλέον δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί για ποιο λόγο μόνο ορισμένοι ασθενείς με NAFLD θα εκδηλώσουν τελικά τα πιο προχωρημένα στάδια της νόσου συμπεριλαμβανομένου του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Ως εκ τούτου, η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος θεωρείται μία πολυπαραγοντική πάθηση, όπου γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν και οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου ή καθορίζουν την πορεία της. Με “μελέτες σύνδεσης ολόκληρου του γονιδιώματος” (“genome-wide association study”) έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένα γονίδια σε μεγάλο αριθμό ασθενών με NAFLD [80]. Από το σύνολο των γενετικών συσχετίσεων στη βιβλιογραφία, δύο είναι αυτές που ξεχωρίζουν λόγω της συσχέτισης τους με τη βαρύτητα της νόσου αλλά και λόγω της αναγνώρισής 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 [80]. Έχει παρατηρηθεί πως η παρουσία του αλληλόμορφου γονιδίου PNPLA3148M σχετίζεται με αυξανόμενη HTGC (Hepatic Triglyceride Context) που προσδιορίζεται με ¹H-MRS [81]. 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 ΗΚΚ [82]. 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 ΗΚΚ. Αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η παραπάνω μετάλλαξη συνεισφέρει στην παθογένεια της νόσου παραμένει υπό διερεύνηση, είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη PNPLA3 ή αδιπονουτρίνη είναι μία λιπάση των τριγλυκεριδίων που ρυθμίζει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων στα λιποκύτταρα. Ο παραπάνω πολυμορφισμός πιθανόν οδηγεί σε αλλαγές στην αρχιτεκτονική του λιπώδους ιστού και σε μεταβολές στον μεταβολισμό της ρετινόλης στα κύτταρα Kupffer [80].

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 ¹H-MRS και με την εξέλιξη της νόσου [83]. 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 λιποπρωτεϊνών, τριγλυκεριδίων και apoB, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων και τη λιπώδη διήθηση του ήπατος [80].

Ορισμένοι επιπλέον γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου επισημαίνονται στον Πίνακα 2. Οι μηχανισμοί ταξινόμησης και συναρμολόγησης συστατικών 50 (SAMM-50) συμμετέχουν στην εμφάνιση και εκδήλωση προχωρημένου σταδίου της NAFLD σε πληθυσμό της Κορέας. Επιπλέον, το farnesyl diphosphate farnesyl transferase I (FDFT1) συσχετίζεται με την αυξημένη σοβαρότητα της δραστηριότητας της NAFLD, το collagen type XIII alpha 1 (COL13A1) συσχετίζεται με την αυξημένη σοβαρότητα της ίνωσης, και τα neurocan (NCAN) και glucokinase regulatory protein (GCKR) συσχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο ηπατικής στεάτωσης. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι rs133291 του sterol regulatory element binding transcription factor 2 (SREBF2), rs641738 του membrane bound O-acyltransferase domain-containing 7 transmembrane channel-like 4 (MBOAT7-TMC4), και rs72613567 του 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 13 (HSD17B13) συσχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο NASH[60,79,80].

Πίνακας 2. Γονίδια που σχετίζονται με ανάπτυξη και πρόοδο της νόσου.

Γονίδιο	Ιστός που εκφράζεται	Λειτουργία	Αλλαγές/Πολυμορφισμοί	Επίδραση/Συσχετίσεις
<i>PNPLA3</i>	Ήπαρ, λιπώδης ιστός αμφιβληστροειδής	Αναδιαμόρφωση σταγονιδίων. Μεταβολισμός λιπιδίων	Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας: rs738409 C>G/p.I148M	↑ NAFLD, NASH, ίνωση, HCC
<i>TM6SF2</i>	Ήπαρ και λεπτό έντερο	Έκκριση και μεταφορά VLDL και χοληστερόλης	Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας: rs58542926 C>T/p.E167K	↑ NAFLD, NASH, ίνωση
<i>GCKR</i>	Κυρίως ήπαρ	Ρύθμιση <i>de novo</i> lipogenesis. Ομοιοστασία γλυκόζης αίματος	Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας: rs1260326 C>T/p.P446L και rs780094 C>T/intronic	↑ NAFLD, NASH, ίνωση
<i>MBOAT7</i>	Σε όλους, αυξημένη στο ήπαρ	Αναδιαμόρφωση Phosphatidylinositol	Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας : rs641738 (C>T)/?	↑ NAFLD, NASH, ίνωση
<i>HSD17B13</i>	Σε όλους, αυξημένη στο ήπαρ	Αναδιαμόρφωση σταγονιδίων. Μεταβολισμός ρετινόλη	Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας: rs72613567 A>T/intronic και rs143404524/frame shift	Προστατευτική δράση. ↓ NAFLD, NASH, ίνωση, HCC

1.5 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Παρά το τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον που υπάρχει τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση της φυσικής ιστορίας και της παθογένειας της NAFLD, οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Όπως προαναφέρθηκε, στην NAFLD, η απλή στεάτωση αντιστοιχεί στην παρουσία λίπους σε ποσοστό >5% του ηπατικού παρεγχύματος και σε περίπου 20-25% των περιπτώσεων εξελίσσεται σε NASH. Από αυτούς τους ασθενείς περίπου το 20% τελικά θα οδηγηθεί σε προχωρημένη ίνωση και στη συνέχεια την κίρρωση [84]. Αν και η παθογένεια της στεατοηπατίτιδας εξακολουθεί να μην είναι πλήρως κατανοητή, η λιποτοξικότητα, η δυσλειτουργία των μιτοχondρίων, το οξειδωτικό στρες και η διαταραχή του εντερικού μικροβιώματος αποτελούν παράγοντες εξέλιξης της NASH [85]. Σήμερα, αποδεκτό μοντέλο για την ανάπτυξη της φλεγμονής είναι η διαδικασία "πολλαπλών επιθέσεων", στην οποία εμπλέκονται πολλαπλοί παράγοντες όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, το οξειδωτικό στρες, η απόπτωση και η διαταραχή των αδιποκινών [86].

Η παραπάνω θεώρηση βασίστηκε στην αρχική "υπόθεση των δύο χτύπημάτων στη NAFLD που προτάθηκε το 1998 από τον Day et al.[87]. Το πρώτο χτύπημα αντικατοπτρίζει τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) στα ηπατοκύτταρα, το οποίο είναι αποτέλεσμα της αντίστασης στην ινσουλίνη, της ενισχυμένης διατροφικής εισροής και της αυξημένης ηπατικής λιπογένεσης [87]. 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[86]. Πρόκειται ουσιαστικά για μία ανισορροπία μεταξύ της παροχής λιπαρών οξέων στο ήπαρ, της σύνθεσης και οξείδωσης των λιπαρών και της εξαγωγής τριγλυκεριδίων από το ήπαρ σε μορφή πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDLs) [88].

Το δεύτερο χτύπημα περιλαμβάνει τη λιποτοξικότητα, τη δυσλειτουργία των μιτοχondρίων και τη φλεγμονή, που οδηγεί στη βλάβη των ηπατοκυττάρων και στην ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης [87]. Αυτή μεσολαβείται από φλεγμονώδεις παράγοντες όπως κυτοκίνες και αδιποκίνες. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η παραπάνω υπόθεση έχει τροποποιηθεί, διότι αναγνωρίστηκε πως τα ίδια τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) προκαλούν ηπατοτοξικότητα, χωρίς την επίδραση του 2ου βήματος, αλλά μέσω αύξησης του οξειδωτικού στρες και μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών της φλεγμονής[86].

Επιπλέον, για να διευκρινιστεί η εξέλιξη της NASH σε ίνωση, ήταν απαραίτητο να αναγνωρισθεί 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 στρες 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 χτύπημα και φαίνεται να καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τόσο την εμφάνιση αλλά και το στάδιο της ίνωσης/κίρρωσης [89].

Ηπατική συσσώρευση λιπιδίων

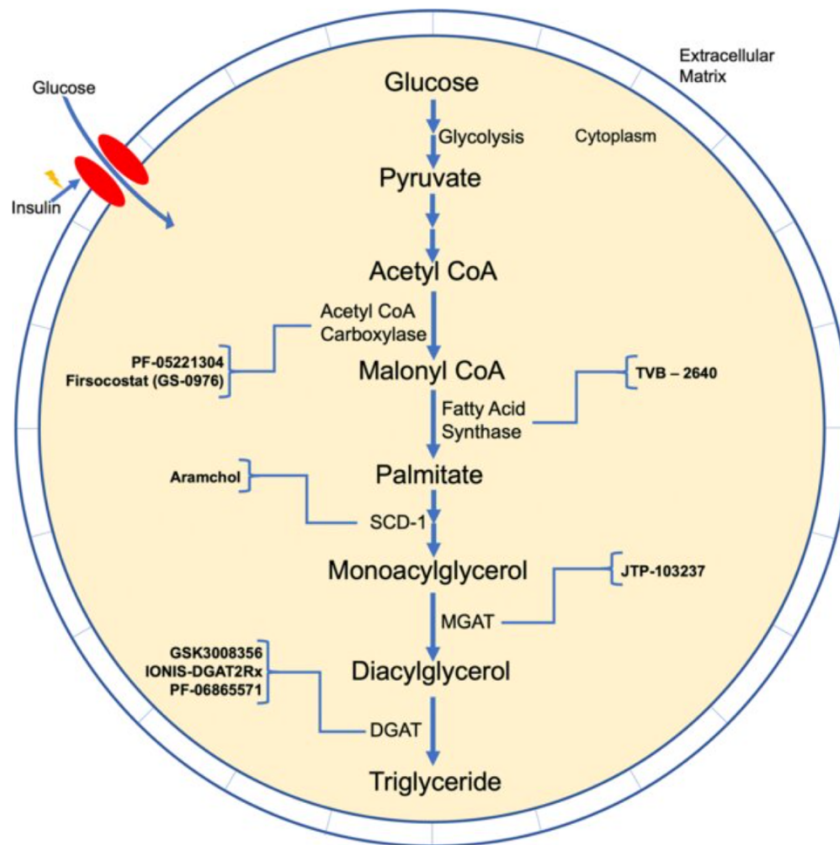
Η NAFLD, όπως αναφέρθηκε οφείλεται στη συσσώρευση τριγλυκεριδίων, τα οποία σχηματίζονται από την εστεροποίηση των FFA με τη γλυκερόλη εντός των ηπατοκυττάρων. Η αύξηση των FFA μπορεί να προέρχεται από τρεις διαφορετικές πηγές. Α) Λιπόλυση (60%) Β) *de novo* lipogenesis (DNL) (26%) Γ) Διατροφή. (15%) [90].

A. Διατροφή

Τα λιπαρά οξέα της διατροφής απορροφώνται από το λεπτό έντερο, συναρμολογούνται στα χυλομικρά και εκκρίνονται στο αίμα, όπου η πλειονότητά τους αποθηκεύεται στον λιπώδη ιστό, ενώ το υπόλοιπο προσλαμβάνεται από το ήπαρ[85]. Κατά τη μεταγευματική περίοδο, τα λιπαρά οξέα που φτάνουν στο ήπαρ προέρχονται από υπολείμματα χυλομικρών και από χυλομικρά με περίσσεια λιπαρών οξέων. Αντίθετα, σε συνθήκες νηστείας, αυτά προέρχονται από τη λιπόλυση του λιπώδους ιστού. Ακόμη, έχει φανεί πως το είδος αλλά και η σύσταση των λιπαρών οξέων της διατροφής πιθανά επηρεάζει την ηπατική συσσώρευση του λίπους [91].

B. *De novo* lipogenesis (DNL): Η ηπατική νεοσύνθεση λιπαρών οξέων είναι ένα μεταβολικό μονοπάτι, με το οποίο τα κύτταρα μετατρέπουν την περίσσεια υδατανθράκων, συνήθως τη γλυκόζη, σε λιπαρά οξέα [85]. Η DNL, δηλαδή η μετατροπή acetyl-CoA σε malonyl-CoA μέσω του acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) και τελικά σε παλμιτικό οξύ (Εικόνα 5), θεωρείται σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη της NAFLD [90]. Η DNL ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c), και carbohydrate response element binding protein (ChREBP). [90]Στη NAFLD

παρατηρείται αυξημένη έκφραση SREBP1c, ο οποίος πιστεύεται ότι ενεργοποιείται από την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον liver X receptor α (LXR α). Κάποιες μελέτες διατυπώνουν ότι τελικά η χρόνια υπερβολική παροχή λιπιδίων, και όχι ινσουλίνη, επάγει τελικά την ηπατική DNL [92]. Ο ChREBP διεγείρει την έκφραση γονιδίων γλυκόλυσης, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα υποστρώματος για την DNL και επάγει έκφραση της stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1)[93]. Το ένζυμο αυτό ευθύνεται για τη μετατροπή των κορεσμένων σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, οδηγώντας σε αυξημένη συσσώρευση τριγλυκεριδίων (TG) [94]. Τέλος, έχει φανεί πως η υπερκατανάλωση φρουκτόζης συγκεκριμένα οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της DNL.



Εικόνα 5 De novo lipogenesis (Πηγή: Aggarwal, P et al. *Curr Hepatology Rep* 19, 302–314 (2020) [95])

Γ. Λιπόλυση: Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το 59% των λιπαρών οξέων προέρχονται από την κυκλοφορία. Η απελευθέρωση των λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό συμβαίνει υπό τον έλεγχο της λιπάσης των τριγλυκεριδίων adipose triglyceride lipase (ATGL) [85]. Η αντίσταση στην ινσουλίνη στην παχυσαρκία και τη NAFLD αυξάνει τη λιπόλυση του λιπώδους ιστού και την απελευθέρωση των λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία [96]. Το ήπαρ προσλαμβάνει τα λιπαρά οξέα από την κυκλοφορία τόσο μέσω παθητικής διάχυσης, όσο και μέσω ενεργητικής μεταφοράς. Διάφορες πρωτεΐνες συμμετέχουν, στη διαδικασία αυτή, συμπεριλαμβανομένου του μεταφορέα λιπαρών οξέων CD36, των πρωτεϊνών μεταφοράς λιπαρών οξέων (FATPs) και των πρωτεϊνών σύνδεσης λιπαρών οξέων (FABPs). Ο CD36 μάλιστα σχετίζεται στενά με την ανάπτυξη της NAFLD και η έκφραση του CD36 έχει βρεθεί αυξημένη σε ασθενείς με NAFLD [85].

Τελικά, το σύνολο των λιπαρών οξέων από τις διάφορες πηγές κατευθύνεται στα σταγονίδια λιπιδίων για αποθήκευση ως τριγλυκερίδια (TGs), ενσωματώνεται σε λιποπρωτεΐνες και εκκρίνεται στην κυκλοφορία, χρησιμοποιείται στη β-οξείδωση ή χρησιμοποιείται για μεταμεταφραστικές αλλαγές [85].

Έκκριση λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούνται από έναν πυρήνα λιπιδίων (τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης), ο οποίος περιβάλλεται από μια μονοστιβάδα αποτελούμενη από φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες. Οι VLDL είναι λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε τριγλυκερίδια που εκκρίνονται από το ήπαρ και ρόλος τους είναι η μεταφορά των λιπαρών οξέων σε περιφερικά όργανα όπως τον λιπώδη ιστό, τους μυς και την καρδιά. Η συναρμολόγηση των VLDL διενεργείται σε δύο βήματα, στα οποία συμμετέχουν η apoB και η πρωτεΐνη mitochondrial transfer protein (MTTP) [97]. Στο πρώτο, η apoB κατά την σύνθεσή της προσλαμβάνει λιπίδια στο ενδοπλασματικό δίκτυο από την MTTP που οδηγούν στο σχηματισμό των πρόδρομων σωματιδίων. Το ώριμο σωματίδιο της VLDL σχηματίζεται με περαιτέρω πρόσληψη λιπιδίων από τα σταγονίδια λιπιδίων και το ενδοπλασματικό δίκτυο [97].

Η έκκριση των VLDL σχετίζεται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και την πρόοδο της NAFLD. Η ινσουλίνη μειώνει την απομάκρυνση των λιπιδίων από το ήπαρ επάγοντας την

αποδόμηση της apoB και αναστέλλοντας τη σύνθεση της MTTP [98]. Στην NAFLD, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή και έκκριση VLDL, και μάλιστα έχει φανεί πως είναι ανάλογη του περιεχομένου του ήπατος σε τριγλυκερίδια [99]. Ωστόσο, όταν το ποσοστό ηπατικού λίπους ξεπεράσει το 10% , η έκκριση των VLDL σταθεροποιείται και δεν αυξάνεται περισσότερο [93]. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι οι ρυθμοί σύνθεσης της apoB είναι χαμηλότεροι σε ασθενείς με NASH από ότι στην ομάδα ελέγχου χωρίς NASH [85]. Συνεπώς, η ικανότητα του ήπατος να διατηρεί την ισορροπία μεταξύ αποθήκευσης λιπιδίων και απομάκρυνσής τους μέσω των VLDL διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πορεία και εξέλιξη της νόσου.

Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου των ηπατοκυττάρων- ο ρόλος των μιτοχονδρίων

Στα πλαίσια της NAFLD τα ηπατοκύτταρα μπορούν να υποστούν βλάβη με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός οφείλεται στη μεταβολική επιβάρυνση των μιτοχονδρίων από την ανάγκη μεταβολισμού της περίσσειας των ελεύθερων λιπαρών οξέων [90]. Εκτός από την β-οξείδωση και την παραγωγή του ATP, τα μιτοχόνδρια διαθέτουν και άλλες βασικές λειτουργίες όπως η παραγωγή ROS (reactive oxygen species) και Ca^{2+} σηματοδότηση [85]. Πρόσφατα, έχει διατυπωθεί πως τα μιτοχόνδρια σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους και την κυτταρική απόπτωση. Ακόμα, αλληλεπιδρούν με άλλα οργάνδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τη λιπδική σταγόνα και τα λυσοσώματα. Λόγω των παραπάνω λειτουργιών, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχει συσχετιστεί με πολλές μεταβολικές νόσους, συμπεριλαμβανομένης της NAFLD, της NASH και της HKK [85].

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μέσω μειωμένης β-οξείδωσης, μειωμένης παραγωγής ATP, αύξηση των ROS και του οξειδωτικού στρες οδηγεί στην κυτταρική βλάβη και δομική μεταβολή των μιτοχονδρίων. Αυτές οι αλλαγές στη λειτουργία και τη δομή των μιτοχονδρίων επάγουν την συσσώρευση λίπους στο ήπαρ και ενεργοποιούν τη φλεγμονή και την ίνωση, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη και την πρόοδο της NAFLD [100]. Στα αρχικά στάδια της NAFLD, τα μιτοχόνδρια προσαρμόζονται στο αυξημένο μεταβολικό φορτίο, αυξάνοντας την β-οξείδωση, τη μιτοχονδριακή λειτουργία και την κετογένεση [101]. Ωστόσο, κατά την εξέλιξη της νόσου προς την NASH αυτή η ικανότητα μιτοχονδριακής προσαρμογής χάνεται και τελικά αυξάνεται η παραγωγή ROS, προκαλείται βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA, στρες στο ER, φλεγμονή και τελικά επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος [85].

Τα ROS ενεργοποιούν φλεγμονώδη σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό του NF-κB και JNK και επάγουν την έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων όπως το TNF-α και το TGF-β [102].

Η φλεγμονή οδηγεί σε ενεργοποίηση αστεροειδών κυττάρων και μετατροπή τους σε μυοϊνοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο και προκαλούν την ίνωση του ηπατικού παρεγχύματος[85].

Επιπλέον, τα ίδια τα FFA οδηγούν άμεσα σε ηπατοκυτταρική βλάβη μέσω αύξησης του stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων, που με τη σειρά του οδηγεί σε μιτοχονδριακή βλάβη και κυτταρικό θάνατο μέσω της caspase-2-mediated cleavage της BH3-only protein BID[103]. Τέλος, έχει προταθεί πως τα FFA ενεργοποιούν υποδοχείς υπεύθυνους για την απόπτωση (death receptors) όπως FAS, DR5 και TNFR1[103].

Φλεγμονή/Στεατοηπατίτις

Η στεάτωση 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 (Natural killer T) κύτταρα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως διαφορετικά μόρια ή ουσίες είναι ικανές να πυροδοτήσουν τη φλεγμονή στο λιπώδες ήπαρ [103]. Τα FFA, η βακτηριακή ενδοτοξίνη και τα μοριακά υπολείμματα DAMPs από νεκρωμένα ηπατοκύτταρα πυροδοτούν τη φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης Toll-like υποδοχέων (TLR), κυρίως TLR3, TLR4 αλλά και scavenger receptors σε στοχευμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού, με αποτέλεσμα την παραγωγή διαμεσολαβητών φλεγμονής [84,103]. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που μεσολαβούν είναι ο TNF-α και οι ιντερλευκίνες IL-15, IL-6, IL-1 β. Μάλιστα, η επίδραση των κυττάρων Kupffer στα ηπατικά τριγλυκερίδια διαμεσολαβείται από την IL-1β, η οποία καταστέλλει το γονίδιο PPAR-α που σχετίζεται με την οξείδωση των λιπιδίων [84]

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 μείωσης της μιτοχονδριακής β-οξείδωσης και των επιπέδων ATP [104]. Οι διαταραχές στο μεταβολισμό του σιδήρου ενοχοποιούνται για την έναρξη της φλεγμονής στην περίπτωση του λιπώδους ήπατος, κυρίως μέσω αύξησης του ενδοκυττάριου 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 [13].

Η απελευθέρωση χυμοκινών από τα ηπατοκύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη προσελκύει τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα μέσω των CCR chemokine receptors (CCR) 2, τα οποία διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Αυτά τα κύτταρα συμβάλλουν επιπλέον στην πρόοδο της NASH διατηρώντας ένα φλεγμονώδες περιβάλλον και ενεργοποιώντας τα αστεροειδή κύτταρα που απελευθερώνουν τον CCR5. Τα αστεροειδή είναι η κύρια πηγή πρωτεϊνών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και θεωρούνται οι κύριοι μεσολαβητές της ινωδογένεσης στην NAFLD [93].

Η συσσώρευση των λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα μπορεί να επάγει την ινωδογένεση των αστεροειδών κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης διαφόρων διαμεσολαβητών, όπως ο transforming growth factor- β (TGF- β). Η ίνωση προοδεύει παράλληλα με αλλαγές στην αγγειογένεση, οδηγώντας τελικά στις αρχιτεκτονικές μεταβολές που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη της κίρρωσης. Επιπλέον, το αυξημένο στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (αυξημένη έκφραση των δεικτών στρες ER Chop και Grp78) και η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη στεατοηπατίτιδας και πρόοδο της νόσου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών, τα πιο άφθονα μη παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος, συμμετέχουν στη μεταφορά μεταβολιτών μέσω των διακυτταρικών τους συνδέσεων. Αυτή η λειτουργία χάνεται κατά την ανάπτυξη της ίνωσης λόγω απώλειας των κενών ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών[93].

Ο ρόλος του λιπώδους ιστού στη φλεγμονή- Αδιποκίνες

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί την κύρια πηγή FFA και συμμετέχει στη φλεγμονή με πολλούς μηχανισμούς. Πέρα από την επίδρασή του στην αντίσταση στην ινσουλίνη, το σπλαχνικό λίπος (VAT: visceral adipose tissue) 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 α και IL-1 β) [84,105]. Αυτές σε συνδυασμό με τον plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), την λεπτίνη και τις αδιποκίνες εκκρίνονται στην κυκλοφορία και στη συνέχεια προσλαμβάνονται από το ήπαρ [84]. Ο λιπώδης ιστός θεωρείται το μεγαλύτερο ενδοκρινές όργανο, διότι παράγει και εκκρίνει ορμόνες, κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και εξωκυττάριας πρωτεΐνες.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τις αδιποκίνες και τον ρόλο τους στο λιπώδες ήπαρ. 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. Αν και αρχικά θεωρήθηκε πως η λεπτίνη συμμετέχει στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, προάγοντας τη φλεγμονή και την ίνωση, αυτή η υπόθεση δεν επιβεβαιώθηκε σε μεταγενέστερες μελέτες. Αντίθετα, η αδιπονεκτίνη πιστεύεται πως έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και πως είναι ικανή να αυξήσει την ευαισθησία στην ινσουλίνη [106]. Η αδιπονεκτίνη είναι μια πρωτεΐνη που αναστέλλει τη γλυκονεογένεση του ήπατος και καταστέλλει τη λιπογένεση. Η δράση αυτή μεσολαβείται κυρίως από την ενεργοποίηση της AMP μεσολαβούμενης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) και του PPAR- α , προάγοντας έτσι την οξειδωση των λιπαρών οξέων στον ήπαρ και τους μυς [84]. Οι ασθενείς με NAFLD έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση αδιπονεκτίνης από τα φυσιολογικά άτομα παρά την υψηλότερη λιπόλυση και τα υψηλά επίπεδα λιπαρών οξέων. Επομένως, η χαμηλή αδιπονεκτίνη στη NAFLD ενισχύει τον υπερβολικό φορτίο των ελεύθερων λιπαρών και την οξειδωση των λιπιδίων και συνεπώς παίζει ρόλο στην πρόοδο από τη στεάτωση στην NASH [84]

Ο ρόλος του εντερικού μικροβιώματος

Το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα αποτελείται κυρίως από αναερόβια βακτήρια και ο γαστρεντερικός σωλήνας φιλοξενεί τρία κυρίαρχα βακτηριακά φύλα: τα Gram (+) Firmicutes και Actinobacteria, και τα Gram (-) Bacteroidetes. Στους ενήλικες, περίπου το 60% -80% του εντερικού μικροβιώματος αποτελείται από Firmicutes και περίπου το 20% -40% από Bacteroidetes [107][62]. Το εντερικό μικροβίωμα συμμετέχει σε πλήθος λειτουργιών, όπως την προστασία από παθογόνα, την πέψη των πολύπλοκων υδατανθράκων, τη σύνθεση βιταμινών και την αποθήκευση λίπους.

Μέσω των σφικτών διακυτταρικών συνδέσεων και μέσω των εξειδικευμένων κυτταρικών δομών ο βλεννογόνο του εντέρου λειτουργεί ως φραγμός άμυνας που αποτρέπει την είσοδο των βακτηρίων και των προϊόντων τους [13]. Αυτά είναι η ενδοτοξίνη και τα λιποπολυσακχαρίδια που προέρχονται από το τοίχωμα των Gram (-) βακτηριδίων. Ωστόσο, σε διαταραχή του εντερικού φραγμού, επιτρέπεται η είσοδος βακτηρίων και ενδοτοξίνης στον γαστρεντερικό σωλήνα, με επακόλουθο την μεταφορά στην πυλαία και συστηματική κυκλοφορία. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται βακτηριακή αλλόθεση [84].

Έχει διαπιστωθεί ότι οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν αυξημένη εντερική διαπερατότητα, η οποία σχετίζεται πιθανώς με μικροβιακή υπερανάπτυξη. Η ενδοτοξίνη και τα προϊόντα των μικροοργανισμών ασκούν προ-φλεγμονώδη δράση μέσω των TLR υποδοχέων, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης από τα ηπατοκύτταρα, τα κύτταρα Kupffer και τα αστεροειδή κύτταρα [84]. Οι περισσότερες μελέτες για την εξακρίβωση του μηχανισμού πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους 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 [13]. 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 [13].

Ο ρόλος του εντερικού μικροβιώματος στην παθογένεια της NAFLD έχει αναγνωριστεί και από μελέτη σε αρουραίους που έλαβαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (High Fat Diet, HFD) [108]. Η μελέτη έδειξε ότι αυτά τα ζωικά μοντέλα της NAFLD, όταν έλαβαν αντιβιοτικά για τη ρύθμιση της μικροβιακής χλωρίδας, παρουσίασαν σημαντική αύξηση των μεταβολιτών χολικών οξέων, οι οποίοι ανέστειλαν τη σήμανση του εντερικού farnesoid X receptor (FXR). Αυτό οδήγησε σε μείωση της συσσώρευσης τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, η μείωση των επιπέδων των κεραμιδίων στον ορό και στον ειλεό ανέστειλε τη δράση της ηπατικής SREBP1C του ήπατος και μείωσε την DNL. Έτσι, ο αναστολέας του εντερικού FXR, αποτελεί έναν δυνητικό θεραπευτικό παράγοντα που μελετάται σήμερα για την NAFLD.

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 λιπιδική 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-1 β και TNF [13]. 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 [109]. Γενικά, οι βιοδραστικοί διαμεσολαβητές προερχόμενοι από ω -6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα πιστεύεται ότι έχουν προφλεγμονώδη επίδραση (όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια και υδροξυεικοσατετραενοϊκά οξέα). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως τα φωσφολιπίδια των ηπατικών μεμβρανών των ασθενών με NAFLD περιέχουν περισσότερα ω -6 παρά ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids, PUFA), 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 κύτταρο. Τα συγκεκριμένα λιπίδια είναι ικανά να οδηγήσουν σε ηπατοκυτταρική απόπτωση, μέσω ενεργοποίησης της JUN N-terminal kinase και μιτοχονδριακών μονοπατιών απόπτωσης αλλά και μέσω ERS και ενεργοποίησης της φλεγμονής [109].

1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Διάγνωση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος

Η διάγνωση της νόσου γίνεται με βάση ένα συνδυασμό κλινικών παραγόντων και απεικόνισης του ήπατος. Η πλειονότητα των ασθενών με NAFLD είναι ασυμπτωματικοί ή παρουσιάζουν μη ειδικά συμπτώματα, όπως κόπωση, διαταραχή του ύπνου και ήπια ενόχληση στο δεξιό υποχόνδριο. Ορισμένοι από αυτούς μπορεί να παρουσιάζουν ηπατομεγαλία, μελανίζουσα ακάνθωση ή λιπώματα. Δυστυχώς, όταν οι ασθενείς παρουσιάσουν ειδικά συμπτώματα, τότε η νόσος έχει ήδη εξελιχθεί σε κίρρωση και έχει διαγνωστεί λόγω συμπτωμάτων πυλαίας υπέρτασης. Περίπου 48-100% των ασθενών με NASH είναι ασυμπτωματικοί και αρκετά συχνά η νόσος αναγνωρίζεται κατά τη διάρκεια ιατρικών εξετάσεων για άλλους λόγους. Αν και τα κλινικά σημεία χρόνιας ηπατικής ανεπάρκειας είναι σπάνια ορατά σε αυτήν την ομάδα ασθενών, κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης, η σπληνομεγαλία είναι παρούσα στο 25% των ασθενών [110].

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[111]. Σε ασθενείς με NAFLD, η αυξημένη τιμή της ALT είναι πιο συχνή από την αύξηση της AST. Ακόμη, στη στεατοηπατίτιδα τα επίπεδα της ALT τείνουν να είναι υψηλότερα από ό,τι στο απλό λιπώδες ήπαρ. Συχνά, σε ασθενείς με NAFLD παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα φερριτίνης, ενώ στο 6-11% των ασθενών αναγνωρίζεται αυξημένος κορεσμός τρανσφερρίνης. Η τιμή της ALP μπορεί να είναι παθολογική και σε ορισμένες περιπτώσεις 2-3 φορές υψηλότερη από το ανώτατο όριο της φυσιολογικής τιμής[110].

Ένας σημαντικός αριθμός ασθενών σήμερα διαγιγνώσκεται με NAFLD μετά από ανεύρεση λιπώδους διήθησης ήπατος σε τυχαίο απεικονιστικό έλεγχο, συνήθως υπερηχογράφημα άνω κοιλίας. Μέχρι πρόσφατα και πριν την καθιέρωση του νέου όρου MASLD, η διάγνωση της NAFLD απαιτούσε τον αποκλεισμό όλων των άλλων χρόνιων ηπατικών νόσων και των δευτεροπαθών αιτιών της λιπώδους διήθησης όπως είναι τα φάρμακα. Συγκεκριμένα, οι ηπατοπάθειες που κρινόταν απαραίτητο να αποκλειστούν είναι οι: ηπατοπάθεια οφειλόμενη σε αυξημένη χρόνια κατανάλωση αλκοόλ (>20 g /ημέρα για τους άνδρες ή >10 g/ 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) [112] . Ο αποκλεισμός άλλων αιτιών στεάτωσης του ήπατος κρίνεται σήμερα απαραίτητος στους ασθενείς που αναγνωρίζεται στεάτωση χωρίς την παρουσία ενός κριτηρίου του μεταβολικού συνδρόμου. Αντίθετα, η παρουσία στεάτωσης και ενός κριτηρίου μεταβολικού συνδρόμου αρκεί για να τεθεί πλέον η διάγνωση της MASLD [113]

Απεικόνιση

Για τη λιπώδη νόσο του ήπατος μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνικές απεικόνισης για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, ωστόσο καμία από αυτές δε χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ των ιστολογικών υποτύπων της νόσου. Το υπερηχογράφημα ήπατος είναι μία ευρέως διαθέσιμη μη επεμβατική εξέταση. Το ήπαρ λόγω λιπώδους διήθησης παρουσιάζει αυξημένη ηχογένεια. 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 [114]. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία και η ειδικότητα του υπερηχογραφήματος για τον εντοπισμό της στεάτωσης υπολογίζεται στο 89% και 93% για τον εντοπισμό αντίστοιχα [110]. Επιπλέον, δεν είναι δυνατή η αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της στεάτωσης που είναι απαραίτητη για την παρακολούθηση των ασθενών ειδικότερα μετά από θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Η αξονική τομογραφία αλλά και η απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό μπορούν να ανιχνεύσουν τη λιπώδη διήθηση του ήπατος. Στην CT (computed tomography) παρατηρείται ελαττωμένη πυκνότητα στο ηπατικό παρέγχυμα, ενώ στην MRI (Magnetic Resonance Imaging) το ήπαρ παρουσιάζει υψηλό σήμα λόγω του λίπους. Η in vivo Φασματογραφία Μαγνητικού Συντονισμού (In vivo MRS) αποτελεί μια πιο ειδική μέθοδο με υψηλή ευαισθησία που επιτρέπει επιπρόσθετα τον ποσοτικό προσδιορισμό της στεάτωσης. Ωστόσο, είναι υψηλού κόστους και όχι ευρέως διαθέσιμη στην κλινική πράξη. Γενικά, η ευαισθησία της CT, της MRI και της MRS για τον εντοπισμό της στεάτωσης ήταν αντίστοιχα 33%, 50% και 88%. Η ειδικότητα των τριών αυτών μεθόδων έχει υπολογιστεί στο 100%, 83% και 63% αντίστοιχα [110]

Τέλος, η βιοψία ήπατος παραμένει ακόμα και σήμερα η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τη διάγνωση και την παρακολούθηση των ιστολογικών αλλαγών της νόσου. Ωστόσο, αποτελεί μία επεμβατική μέθοδο με κίνδυνο επιπλοκών, η οποία δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση (screening) και την παρακολούθηση της εξέλιξης. Λαμβάνοντας υπόψιν τον μεγάλο επιπολασμό της νόσου και την απουσία εγκεκριμένης ειδικής θεραπείας παραμένει ακόμη και

σήμερα αμφιλεγόμενο το αν σε κάθε ασθενή είναι απαραίτητα η διεξαγωγή βιοψίας του ήπατος. Βασική ένδειξη αποτελεί η ανάγκη επιβεβαίωσης ή αποκλεισμού της διάγνωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως, αν και θεωρείται μέθοδος αναφοράς λόγω ανομοιογενούς κατανομής των ιστολογικών βλαβών και της μεταβλητότητας μεταξύ των παρατηρητών, παρουσιάζει περιορισμούς στην χρήση της για την εκτίμηση της ίνωσης [110].

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 ή 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 (πéριξ 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).

1.8 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.

Βιοδείκτες για την ανίχνευση 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%. Επιπλέον, οι αυξημένες τιμές σχετίζονται με την εμφάνιση της στεατοηπατίτιδας αλλά όχι με το στάδιο της ίνωσης [115].

Γενικά, ένας μόνος βιοδείκτης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να αναγνωρίσει τους ασθενείς με NAFLD. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν διάφορα σκορ που βασίζονται σε βιοχημικές παραμέτρους ορού και σε άλλα χαρακτηριστικά των ασθενών. Ανάμεσα σε αυτούς είναι Fatty Liver Test (FLI test) (AUROC 0,79-0,85), το Hepatic steatosis index (AUROC 0,72-0,82) το NAFLD liver fat score (AUROC 0,78-0,87), το Lipid accumulation product (LAP) (AUROC 0,72-0,83). Η διαγνωστική ακρίβεια των παραπάνω σκορ και τεστ έχει υπολογιστεί χρησιμοποιώντας ως μέθοδο αναφοράς το υπερηχογράφημα. Ωστόσο, το υπερηχογράφημα παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία στην ανίχνευση της χαμηλής βαθμού στεάτωσης και επομένως η διαγνωστική ακρίβεια των HSI, FLI, and LAP πιθανόν να έχει υπερεκτιμηθεί. Το Steatotest (AUROC 0,72-0,86), το visceral adiposity index (VAI) (AUROC 0,92) και Triglyceride/index (AUROC 0,90) έχουν αξιολογηθεί σε μελέτες με μέθοδο αναφοράς τη βιοψία ήπατος και συνεπώς θεωρούνται περισσότερο αξιόπιστα [116].

Δεδομένης της διαγνωστικής απόδοσής τους, οι αλγόριθμοι αυτοί μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στον εντοπισμό της ηπατικής στεάτωσης, αλλά προς το παρόν δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη για τη διάγνωση της νόσου ή στη διαδικασία λήψης αποφάσεων στη διαχείριση ασθενών με στεάτωση.

Μέθοδοι και βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόβλεψη της NASH.

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 U/S εξασθένησης εντός του ηπατικού λίπους. Από μία μετα-ανάλυση που συνέκρινε την ιστολογικά διαβαθμισμένη στεάτωση με το CAP και συμπεριέλαβε 2375 ασθενείς αναφέρθηκε AUROC 0,82 με κατώφλι CAP 248 dB/m για στεάτωση $> 11\%$, 0,86 με 268 dB/m για στεάτωση $> 33\%$ και 0,89 με 280 dB/m για στεάτωση $> 66\%$. Σε ασθενείς με NAFLD, τα βέλτιστα όρια για την ανίχνευση της πυκνότητας πρωτονίων με μαγνητική τομογραφία κλάσματος λίπους (MRI-PDFF) $\geq 5\%$ και $\geq 10\%$ ήταν 288 dB/m και 306 dB/m, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία σε παχύσαρκους ασθενείς και 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 αλλά και για το αποτέλεσμα των θεραπευτικών παρεμβάσεων [116].

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 στεατοηπατίτιδα από ότι στην απλή στεάτωση. Εντούτοις, υπάρχει σημαντική επικάλυψη των επιπέδων CK18 μεταξύ ασθενών με και χωρίς NASH. Από μία μετα-ανάλυση 11 μελετών έχει αναφερθεί πως η ευαισθησία ήταν 66% και ειδικότητα 82%, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν είναι επαρκώς ακριβής για κλινική χρήση. Για να αυξηθεί η διαγνωστική ακρίβεια, η CK18 συνδυάστηκε με τα επίπεδα στον ορό του επιφανειακού αντιγόνου FAS (sFAS) που μεσολαβεί στην απόπτωση με AUROC 0,79- 0,83 [117].

Βιοδείκτες φλεγμονής και οξειδωτικούς stress: Η φλεγμονή, όπως αναφέρθηκε, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου και ειδικότερα στην εξέλιξη της 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 τόσο μεγάλες, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι βιοδείκτες. Επιπλέον, το ενδιαφέρον των μελετητών στρέφεται στη χρήση των αδιποκινών ως βιοδεικτών, οι οποίες παίζουν σημαντικό

ρόλο στην παθογένεια της νόσου και σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τις μελέτες παραμένουν αντικρουόμενα [118].

Επιπλέον το οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στη νόσο έχει γίνει αντικείμενο μελέτης για την ανεύρεση βιοδεικτών. 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 [117].

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, το NASH predictive index (NPI), NASHTest (AUROC 0,69- 0,79), το NASH Diagnostic Panel (AUROC 0.81) Η ακρίβεια των παραπάνω μοντέλων είναι πολλά υποσχόμενη αλλά τα περισσότερα εξ αυτών αναπτύχθηκαν με ένα μάλλον μικρό δείγμα ασθενών και χρήζουν περαιτέρω μελέτης για την ένταξη στην κλινική πράξη [117].

Μέθοδοι και βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόβλεψη της ίνωσης

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 [118]. Μάλιστα, το FIB-4 και το NAFLD fibrosis score συστήνονται ως εργαλεία αρχικού screening για την πρώτη εκτίμηση των ασθενών με την πάθηση και βοηθούν στην αναγνώριση ασθενών που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης και πιο εντατικής παρακολούθησης [113].

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 το υψηλό κόστος και η περιορισμένη διαθεσιμότητα καθιστούν απίθανη τη χρήση της στο screening [117].

2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙCS

2.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών που χαρακτηρίζει μία παθολογική κατάσταση, έχει αναδειχθεί ως ένα σημαντικό πεδίο έρευνας τόσο για την κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών, όσο και για ανίχνευση βιοδεικτών. Το πεδίο των “metabolomics” περιλαμβάνει την ανάλυση και ποσοτικοποίηση μικρών μορίων γνωστών ως μεταβολίτες εντός των βιολογικών συστημάτων [119,120]. Ορίζεται ως η μελέτη του συνόλου των μεταβολιτών, γνωστό ως “metabolome” που εμπλέκονται σε μεταβολικές διεργασίες και είναι τα ενδιάμεσα και τα τελικά προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, τα οποία καθορίζονται τόσο από γενετικούς, όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες [121]. Αυτή η προσέγγιση παρέχει μία λεπτομερή και αντικειμενική εικόνα της συνολικής μεταβολικής κατάστασης, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για τις δυναμικές μεταβολικές διεργασίες, που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο, ιστό ή σε έναν οργανισμό.

Το ήπαρ θεωρείται το κύριο όργανο του σώματος για τον μεταβολισμό, την αποθήκευση ενέργειας αλλά και την αποτοξίνωση. Το ήπαρ όχι μόνο αποτελεί πηγή αμέτρητων ενδογενών μεταβολιτών και πρόδρομων ενώσεων που χρησιμοποιούνται από άλλα όργανα, αλλά διαθέτει και πλήθος ενζύμων που συμμετέχουν σε μεταβολικές διεργασίες ζωτικής σημασίας για τον οργανισμό. Επομένως, το μεταβολικό προφίλ του ήπατος αποτελεί ένα πολύπλοκο και δυναμικό σύνολο μικρών μεταβολιτών μεγέθους $< 1,5\text{kDa}$, το οποίο με τον συνδυασμό φασματοσκοπίας και πολυπαραγοντικής ανάλυσης δεδομένων δύναται να μελετηθεί [122]. Η μελέτη συνήθως επιτυγχάνεται με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy) και φασματοσκοπίας μάζας (mass spectrometry, MS) και ακολούθως απαιτεί την στατιστική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων [123]. Αξίζει να σημειωθεί πως ένα ολοκληρωμένο μεταβολικό προφίλ δεν είναι πάντα εύκολο να αναγνωριστεί με τη χρήση μόνο μίας τεχνικής metabolomics. Κάθε αναλυτική πλατφόρμα, σε συνδυασμό με συγκεκριμένες διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων, παρέχει ένα τμήμα της μεταβολικής κατάστασης του ήπατος. [122]. Παρά τους παραπάνω περιορισμούς, οι μελέτες με -omics τεχνικές σε παθήσεις του ήπατος και των χοληφόρων αποτελούν ένα αρκετά υποσχόμενο πεδίο έρευνας για την ανίχνευση βιοδεικτών

πρώιμης διάγνωσης και πρόγνωσης καθώς και για την κατανόηση της πολύπλοκης παθοφυσιολογίας αυτών των παθήσεων.

Ιδιαίτερα, σε ό,τι αφορά την NAFLD, η μελέτη του μεταβολικού προφίλ, τόσο λόγω του ρόλου του ήπατος στο μεταβολισμό, όσο και λόγω της αιτιολογίας της νόσου, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ακόμη, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η νόσος αποτελεί μία πάθηση που αφορά το 30% του γενικού πληθυσμού παγκοσμίως και η ανακάλυψη μη επεμβατικών βιοδεικτών πρόγνωσης και εξέλιξης σε στεατοηπατίτιδα με ίνωση ή και κίρρωση αποτελεί σήμερα επιτακτική ανάγκη [124]. Από τη βιβλιογραφία, αναφέρονται αναλύσεις με “metabolomics” προσεγγίσεις στην πάθηση με τον παλιότερο όρο μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, που οδήγησαν στην αναγνώριση σημαντικών ποσοτικών διαφορών στους μεταβολίτες του πλάσματος και του ήπατος σε βιοπτικό υλικό.

2.2 METABOLOMICS ΚΑΙ NAFLD

Μεταβολισμός πρωτεϊνών.

Στο ήπαρ, πραγματοποιείται η σύνθεση και ο καταβολισμός των πρωτεϊνών. Τα αμινοξέα (amino acids: AA) απορροφώνται αρχικά από το έντερο και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στο ήπαρ για τη σύνθεση δομικών πρωτεϊνών, πρωτεϊνών μεταφοράς και ενζύμων. Επιπλέον, στο ήπαρ τα AA μπορεί να αποδομηθούν για άμεση παροχή ενέργειας ή για τη γλυκονεογένεση. Αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια απαιτούν ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων, των οποίων η δραστηριότητα συχνά επηρεάζεται στις ηπατικές παθήσεις [125]. Έτσι, σε μελέτες ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ βιολογικών δειγμάτων ασθενών με ηπατικές παθήσεις αναφέρονται αρκετά συχνά διαφορές στη σύσταση των αμινοξέων στον ορό, στο πλάσμα, στο ήπαρ ή την χολή [124,125].

Σε ένα σημαντικό αριθμό κλινικών μελετών έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ των κυκλοφορούντων αμινοξέων και της στεατοηπατίτιδας [124,126]. Η διαταραχή του μεταβολισμού των αμινοξέων που παρατηρείται στο λιπώδες ήπαρ συνδέεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, και συγκεκριμένα με το ρόλο της ινσουλίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Μία βασική λειτουργία της ινσουλίνης είναι η αναστολή του καταβολισμού των πρωτεϊνών και η επακόλουθη διακοπή απελευθέρωσης αμινοξέων κατά τη νηστεία. Ωστόσο, σε περιπτώσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, τα αμινοξέα της κυκλοφορίας αυξάνονται

κατά τη νηστεία, λόγω αυξημένου καταβολισμού πρωτεΐνης στους μύες και λόγω αναστολής του καταβολισμού τους στο ήπαρ και τον λιπώδη ιστό. Η παχυσαρκία συνδέεται με αυξημένα επίπεδα αμινοξέων κατά τη διάρκεια της νηστείας, ειδικότερα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσού (BCAA: Branched-chain amino acid). Ωστόσο, σε ασθενείς με NAFL και NASH υπάρχει κάποια ανομοιογένεια στα αναγνωρισμένα μοτίβα και επίπεδα αμινοξέων. Συγκεκριμένα, αν και στους ασθενείς με απλή στεάτωση τα επίπεδα των BCAAs δεν παρουσιάζουν σημαντική αύξηση σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους, στην NASH, τα επίπεδα τους είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερα, συνοδευόμενα από αυξημένες συγκεντρώσεις αρωματικών αμινοξέων, όπως η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη. Κατά τη μετάβαση από τη NAFL στη NASH, παρατηρείται σημαντική αύξηση αυτών των αμινοξέων, ενώ στην NASH, η αύξηση των BCAAs σχετίζεται με την ετερογένεια και τη σοβαρότητα της ηπατικής ίνωσης. Αυτές οι διαφορές υπογραμμίζουν τον πιθανό ρόλο των αμινοξέων ως βιοδείκτες για την εξέλιξη της νόσου και τη διάκριση μεταξύ των σταδίων της νόσου.

Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσού (Branched-chain amino acids, BCAAs)

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσού περιλαμβάνουν τη βαλίνη, τη λευκίνη και την ισολευκίνη και ανήκουν στα απαραίτητα αμινοξέα, καθώς δεν παράγονται από τα ανθρώπινα κύτταρα, αλλά πρέπει να περιλαμβάνονται στη διατροφή. Σχετίζονται με την ρύθμιση της πρωτεϊνολύσεως αλλά και του μεταβολισμού της γλυκόζης [125]. Επιπλέον, θεωρείται πως αποτελούν μεσολαβητές ενεργοποίησης διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών σηματοδότησης του ήπατος, συμπεριλαμβανομένου της ινσουλίνης και της ρύθμισης γλυκόζης [15]. Οι αλλαγές των επιπέδων τους στο αίμα είναι συχνό εύρημα στους ασθενείς με ηπατικές παθήσεις, ενώ συγκεκριμένα στην NAFLD από ορισμένους ερευνητές έχει αναφερθεί αύξηση των BCAAs [15,127].

Στη νηστεία, οι αυξημένες συγκεντρώσεις αυτών των απαραίτητων αμινοξέων αντανακλούν καταστάσεις καταβολισμού και παρατηρούνται συχνά στην αντίσταση στην ινσουλίνη [124]. Τα επίπεδα των BCAAs ανευρίσκονται αυξημένα στην παχυσαρκία και στον ΣΔΤ2, με υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στους άντρες από ότι στις γυναίκες [127]. Από τις πρώτες μελέτες που αναγνώρισαν διαφορές στα επίπεδα των BCAAs στην NAFLD ήταν αυτή των Kalhan και συν. [126]. Μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ του πλάσματος κατά τη νηστεία σε ασθενείς με στεάτωση και στεατοηπατίτιδα χωρίς διαβήτη και συγκρίθηκε με αυτό των υγιών. Σκοπός ήταν η εντοπισμός βιοδεικτών που σχετίζονται με τη στεάτωση και τη NASH. Συγκρίνοντας αυτές τις ομάδες, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με NASH εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων BCAAs,

φαινυλαλανίνης, γλουταμίνης και ασπαρτικού σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους. Ωστόσο, τα επίπεδα BCAAs δεν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με απλή στεάτωση, σε σχέση με τους υγιείς ανθρώπους. Αυτές οι αλλαγές στα επίπεδα κυκλοφορούντων BCAAs επιβεβαιώθηκαν σε δείγματα βιοψίας ήπατος. Η ανάλυση δειγμάτων ιστού ήπατος με φασματοσκοπία υψηλής ανάλυσης ανέδειξε σημαντική αύξηση των επιπέδων BCAAs, τυροσίνης και φαινυλαλανίνης κατά τη μετάβαση από τη στεάτωση στη NASH [128]. Επιπλέον, σε μελέτη διερεύνησης της επίδρασης των επιπέδων BCAAs στην πάθηση, βρέθηκε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση των επιπέδων των BCAAs με την ετερογένεια της περιοχής των λιπιδικών σταγόνων στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, τα αυξημένα επίπεδα BCAAs συνδέθηκαν με μεγαλύτερη μέγιστη περιοχή λιπιδικών σταγόνων και υψηλότερη ετερογένεια στις σταγόνες αυτές, υποδηλώνοντας ότι οι BCAAs ενδέχεται να παίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία της NAFLD/NASH . [129]. Με βάση τα ευρήματά τους, οι ερευνητές πρότειναν ότι η χορήγηση BCAAs στην προχωρημένη NAFLD και όχι στην πρόιμη νόσο, θα μπορούσε να έχει ευεργετικά αποτελέσματα [129]. Εξάλλου, η χορήγηση των BCAAs στην κίρρωση έχει φανεί πως βοηθά στην πρόληψη της σαρκοπενίας και βελτιώνει τη διαταραχή ανοχής γλυκόζης [130].

Ο ρόλος των BCAAs στη διάκριση των υποτύπων της NAFLD αναδείχθηκε και από μελέτες με στόχο την ανίχνευση βιοδεικτών διάγνωσης και βαρύτητας της νόσου. Στη μελέτη των Gaggini et al., διαπιστώθηκε ότι η παρουσία ηπατοκυτταρικής διόγκωσης και/ή φλεγμονής συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα BCAAs αλλά και αρωματικών αμινοξέων (aromatic amino acids, AAA) στο πλάσμα. Επιπλέον, στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η διάκριση των σταδίων της ίνωσης μπορεί να επιτευχθεί με βάση τις συγκεντρώσεις του γλουταμινικού οξέος (glutamate, Glu), της σερίνης (serine, Ser) και της γλυκίνης (glycine, Gly) [131]. Σε άλλη μελέτη μεταβολικού προφίλ του πλάσματος βρέθηκε μία φύλο-εξαρτώμενη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων BCAAs και του βαθμού σοβαρότητας της NAFLD, υποδεικνύοντας αυξημένο κίνδυνο NASH και σταδίου ίνωσης στις γυναίκες [132]. Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη διάκρισης των σταδίων της νόσου με μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση του πλάσματος σε συνδυασμό με "machine learning" προσέγγιση, βρέθηκε ότι τα BCAAs σε συνδυασμό με άλλους μεταβολίτες μπορούν να βοηθήσουν στην κατηγοριοποίηση σε απλή στεάτωση, NASH και NASH κίρρωση. Οι άλλοι σημαντικοί μεταβολίτες περιλάμβαναν τα αυξημένα επίπεδα γλυκοχολικού οξέος, ταυροχολικού οξέος και φαινυλαλανίνης. Η ακρίβεια του μοντέλου κατηγοριοποίησης για τη διάκριση μεταξύ απλής στεάτωσης, στεατοηπατίτιδας και NASH κίρρωσης ήταν 94,0%, με ευαισθησία 94,1% και ειδικότητα 93,8% [133].

Αρωματικά αμινοξέα (Aromatic Amino Acids, AAA)

Τα αρωματικά αμινοξέα διαθέτουν στη δομή τους ένα δακτύλιο βενζολίου και τα κύρια είναι η τυροσίνη, η φαινυλαλανίνη και η τρυπτοφάνη. Η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη σχετίζονται μεταβολικά, καθώς η τυροσίνη συντίθεται από την φαινυλαλανίνη με τη δράση του ενζύμου υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης. Οι συγκεντρώσεις αυτών των αμινοξέων έχουν βρεθεί ελαττωμένες στο πλάσμα αλλά και στα ούρα ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες [125]. Ωστόσο, τα αρωματικά αμινοξέα φαίνεται να αυξάνονται στην κίρρωση και στην ηπατική ανεπάρκεια μετά από μεταμόσχευση ήπατος. Τα τελικά προϊόντα καταβολισμού των AAA είναι το φουμαρικό (fumarate) και ακετοξικό οξύ (acetoacetate). Συνεπώς, η αύξηση των αμινοξέων αυτών είναι πιθανό να σχετίζεται με μεταβολές στην παραγωγή ενέργειας στο ήπαρ [125].

Αμινοξέα και αντίσταση στην ινσουλίνη

Σε μεγάλης κλίμακας κλινικές μελέτες παρατήρησης, τα υψηλά επίπεδα BCAAs νηστείας στο πλάσμα έχουν σχετιστεί με αντίσταση στην ινσουλίνη στους περιφερικούς ιστούς και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Σε μελέτη παρακολούθησης 12 ετών, εντός της κοόρτης Framingham Offspring, μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ πλάσματος ατόμων που εμφάνισαν στο διάστημα παρακολούθησης διαβήτη [134]. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές εξέτασαν 189 άτομα που ανέπτυξαν διαβήτη και 189 άτομα με αντίστοιχα χαρακτηριστικά ως ομάδα ελέγχου και διαπίστωσαν στενή συσχέτιση μεταξύ υψηλών συγκεντρώσεων αναφοράς BCAAs και AAA-όπως τυροσίνης και φαινυλαλανίνης, με τον κίνδυνο εμφάνισης του διαβήτη τύπου 2 [134]. Τα υψηλά επίπεδα αυτών των αμινοξέων σε άτομα με νορμογλυκαιμία συνδέονται με σημαντικά αυξημένο έως τετραπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη στο μέλλον. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν μεταγενέστερα σε μια ανεξάρτητη ομάδα [134].

Σε ό,τι αφορά όμως το ήπαρ τα AAA, ιδίως η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη, συχνά παρατηρούνται να είναι μειωμένα σε ασθενείς με πάθηση του ήπατος, ενώ τα BCAAs αυξάνονται, κυρίως λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη. Ωστόσο, με την πρόοδο της πάθησης του ήπατος, συχνά παρατηρείται το αντίθετο - υψηλά AAA και μειωμένα BCAAs, ειδικά σε ασθενείς με χρόνια ηπατική ανεπάρκεια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, ενώ τα BCAAs καταβολίζονται κυρίως στους μυς και τον λιπώδη ιστό, ο μεταβολισμός των AAA συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ. Η αύξηση των AAA στη χρόνια ηπατική ανεπάρκεια πιθανά οφείλεται στην ανεπάρκεια καταβολισμού τους. Έτσι, ένας χαμηλός λόγος BCAA προς AAA, γνωστός ως λόγος Fischer, έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση ασθενών με προχωρημένη ηπατική νόσο. Μάλιστα, μία απλοποιημένη έκδοση του λόγου Fischer που χρησιμοποιεί μόνο την τυροσίνη ως παρονομαστή έχει επιδείξει μία καλή προγνωστική αξία για τον πρώιμο καρκίνο του ήπατος [124].

Δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες που εντόπισαν αυξημένα BCAAs στο λιπώδες ήπαρ αφορούσαν κυρίως άτομα με παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη, είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί αν η αύξηση αυτή οφείλεται στο λιπώδες ήπαρ ή στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Για το λόγο αυτό, οι Gaggini et al. [131] διερεύνησαν τις συγκεντρώσεις αμινοξέων σε ασθενείς με λιπώδες ήπαρ, χωρίς τη συνύπαρξη διαβήτη με παχυσαρκία αλλά και χωρίς παχυσαρκία. Στη μελέτη τα επίπεδα των περισσότερων αμινοξέων στο αίμα ήταν αυξημένα μόνο σε άτομα με παχυσαρκία και λιπώδες ήπαρ. Ωστόσο, στους ασθενείς με λιπώδες ήπαρ, χωρίς όμως τη συνύπαρξη παχυσαρκίας (NAFLD-NO), μόνο τα επίπεδα της αλανίνης, γλουταμινικού οξέος, ισολευκίνης και βαλίνης ήταν αυξημένα, αλλά όχι της λευκίνης. Τα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος, τυροσίνης και ο δείκτης GSG (glutamate-serine-glycine index) που αντιστοιχεί σε γλουταμινικό οξύ/(σερίνη + γλυκίνη) συσχετίστηκαν με την αντίσταση στην ινσουλίνη (Hep-IR). Μάλιστα, ο νέος δείκτης GSG ήταν σε θέση να διακρίνει την σοβαρή ίνωση (F3-4) από την απύουσα έως ήπια ίνωση (F0-2) σε αυτή την ομάδα [131].

Τη θετική συσχέτιση ανάμεσα στα BCAAs και την ηπατική ή περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη ανέδειξε και άλλη μελέτη που αφορούσε παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD. Επιπλέον, τα επίπεδα των BCAAs και της τυροσίνης συσχετίζονταν επίσης θετικά με την περιεκτικότητα του ήπατος σε λίπος μετά την προσαρμογή για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ και HOMA-IR [135]. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα, όσο αυξάνεται το στάδιο της ίνωσης τα επίπεδα των BCAAs μειώνονταν, ενώ τα επίπεδα της τυροσίνης φάνηκε να αυξάνονται με την εξέλιξη των φλεγμονωδών σταδίων [136].

Τα ευρήματα των μελετών καταδεικνύουν ότι τα αυξημένα επίπεδα BCAAs και αρωματικών αμινοξέων, όπως η τυροσίνη, συνδέονται στενά με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2. Ειδικά στη NAFLD, τα BCAAs φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με την αυξημένη περιεκτικότητα λίπους στο ήπαρ, ιδιαίτερα σε παχύσαρκα άτομα. Ωστόσο, παρατηρείται ασυμφωνία στις μελέτες αναφορικά με την εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης και τις μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs και της τυροσίνης, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη για καλύτερες συνθήκες σχεδιασμού μελετών προκειμένου να διευκρινιστούν οι βιολογικοί μηχανισμοί που συνδέουν τα αμινοξέα αυτά με την παθοφυσιολογία της NAFLD.

Μεταβολισμός γλυκόζης και κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέος

Το ήπαρ είναι άμεσα εμπλεκόμενο στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στη συνεπακόλουθη παροχή ενέργειας στον οργανισμό. Το ήπαρ είναι το όργανο που περιέχει τα υψηλότερα επίπεδα γλυκογόνου, της αποθηκευτικής μορφής της γλυκόζης, το οποίο συντίθεται μέσω της ηπατικής γλυκονεογένεσης [125]. Τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται επίσης ως υποστρώματα ενέργειας και οξειδώνονται στον κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) για την παραγωγή ATP [124]. Τα επίπεδα των BCAAs στο πλάσμα παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τις μακράς αλυσού ακυλοκαρνιτίνες, αναδεικνύοντας τη σημασία των BCAAs στο μεταβολισμό των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, τα BCAAs είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση του κύκλου TCA στα μιτοχόνδρια, και η διαταραχή του μεταβολισμού των BCAAs φαίνεται να συμβάλλει στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων στην NAFLD [137].

Οι κύριοι μεταβολίτες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και ανιχνεύονται με φασματοσκοπία NMR είναι η γλυκόζη, το γλυκογόνο που ανιχνεύεται στον ηπατικό ιστό, το γαλακτικό και το πυροσταφυλικό [125]. Άλλοι μεταβολίτες που συμμετέχουν στον κύκλο TCA και παρουσιάζουν μεταβολές σε ηπατικές παθήσεις είναι το κιτρικό, το φουμαρικό και το σουκινικό οξύ. Ωστόσο, αλλαγές στα επίπεδα αυτών των αμινοξέων έχουν παρατηρηθεί στις ιογενείς ηπατίτιδες και στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο [125]. Γενικά, η λιπώδης διήθηση του ήπατος προάγει την γλυκόλυση οδηγώντας σε αύξηση του γαλακτικού, πυροσταφυλικού και της αλανίνης στον ορό ή πλάσμα [15]. Σύμφωνα με τη μελέτη των Kalhan et al, η γλυκόζη και το πυροσταφυλικό αυξάνονται σε σημαντικό βαθμό στους ασθενείς με στεατοηπατίτιδα [126]. Τα επίπεδα της μαννόζης, του γαλακτικού και του ερυθρονικού είναι αυξημένα τόσο στην στεάτωση όσο και στην στεατοηπατίτιδα σε σύγκριση με του υγιείς [15].

Αμινοξέα και μεταβολισμός της γλουταθειόνης

Σύμφωνα με ένα σημαντικό αριθμό μελετών η αύξηση του οξειδωτικού στρες στο ήπαρ σχετίζεται με την ηπατική βλάβη και την εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα. Η αύξηση του οξειδωτικού στρες οδηγεί στην κατανάλωση της κύριας ενδοκυτταρικής αντιοξειδωτικής ουσίας, της γλουταθειόνης, και κατά συνέπεια στη μείωση των επιπέδων της στο ήπαρ [124]. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που προέρχεται από το γλουταμινικό, την κυστεΐνη και την γλυκίνη [123]. Ωστόσο, η μεθειονίνη και η σερίνη, ως πρόδρομες ουσίες της κυστεΐνης συμμετέχουν και αυτές στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης της γλουταθειόνης [124].

Υπό οξειδωτικές συνθήκες, το απόθεμα της γλουταθειόνης μειώνεται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η δραστηριότητα της γ-γλουταμυλ-συνθετάσης της κυστεΐνης. Ακολούθως, η περίσσεια της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης μεταβολίζεται από την γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση (γ-GT) και οδηγεί στον σχηματισμό και απελευθέρωση στην κυκλοφορία διαφόρων γ-γλουταμυλ-διπεπτιδίων [138]. Αυτά τα ευρήματα έχουν μεγάλη σημασία, καθώς τα επίπεδα της γ-GT χρησιμοποιούνται μαζί με αυτά των τρανσαμινασών για την εκτίμηση της ηπατικής βλάβης στην περίπτωση της αλκοολικής αλλά και της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος [123].

Σε ό,τι αφορά τους υπόλοιπους μεταβολίτες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γλουταθειόνης, μία μελέτη μεταβολικού προφίλ σε 318 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος ανέδειξε αξιοσημείωτες διαφορές στα κυκλοφορούντα επίπεδα αυτών των αμινοξέων [139]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση του γλουταμινικού και της ισολευκίνης και μείωση των επιπέδων της γλυκίνης και της σερίνης σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη στεατοηπατίτιδα [139]. Μάλιστα, σε αυτή τη μελέτη αναπτύχθηκε και ένα σκορ για τη διάγνωση της στεατοηπατίτιδας, το NASH ClinLipMet με AUROC: 0,866. Εκτός από κλινικά δεδομένα, το σκορ περιλαμβάνει πέντε μεταβολίτες, αποτελούμενους από τρία αμινοξέα, το γλουταμινικό, την ισολευκίνη και την γλυκίνη και από δύο λιπίδια, την λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη. Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα της γλουταθειόνης, τα δεδομένα από διάφορες μελέτες που διεξήχθησαν στο πλάσμα είναι αντικρουόμενα. Ορισμένοι ερευνητές δε διαπίστωσαν διαφορές στα επίπεδα της μεταξύ υγιών και ασθενών με NASH. Ωστόσο σε μελέτη σε παιδιατρικό πληθυσμό παρατηρήθηκε μείωση στην ομάδα της στεάτωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [140–142]. Ορισμένες από αυτές τις μελέτες αφορούσαν κυρίως την εξέταση της κινητικής των αντιδράσεων του μεταβολισμού των αμινοξέων, που εμπλέκονται στη σύνθεση και τον καταβολισμό της γλουταθειόνης. Σύμφωνα με αυτές, δεν παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα νηστείας του πλάσματος της κυστεΐνης, της ομοκυστεΐνης και γλυκίνης [140,141].

Η βεταΐνη αποτελεί παράγωγο της οξείδωσης της χολίνης και προσφέρει ένα εναλλακτικό μονοπάτι για τη μεθυλίωση της ομοκυστεΐνης. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα της βεταΐνης είναι μειωμένα στους ασθενείς με λιπώδη νόσο του ήπατος και μάλιστα έχει βρεθεί μία αρνητική συσχέτιση των επιπέδων της με τη βαρύτητα της ηπατικής φλεγμονής, της διόγκωσης και της ίνωσης. Αν και δεν έχει βρεθεί κάποιος μηχανισμός που να εξηγεί αυτά τα ευρήματα, η χορήγηση της βεταΐνης προστατεύει από την εκδήλωση της νόσου σε ζωικά μοντέλα [124].

Σε μία άλλη μελέτη μεταβολικού προφίλ με στόχο την αναγνώριση των μεταβολικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην εξέλιξη της λιπώδους νόσου του ήπατος, βρέθηκαν διαφορές σε ορισμένα από τα αμινοξέα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της γλυκίνης, της σερίνης, της βεταΐνης και N-

ακετυλογλυκίνης στο πλάσμα ήταν χαμηλότερα σε άτομα με σοβαρού βαθμού στεάτωση σε σύγκριση με τα άτομα με ηπιότερη στεάτωση. Επιπλέον, δε βρήκαν καμία συσχέτιση μεταξύ της ηπατικής στεάτωσης και των επιπέδων της κυστεΐνης και της γλουταμίνης, οι οποίες απαιτούνται επίσης για τη σύνθεση της γλουταθειόνης [143].

Η γλυκίνη, που παράγεται από την σερίνη, συμμετέχει άμεσα στον κύκλο της ουρίας μέσω αποδόμησής της σε αμμωνία και CO_2 . Έτσι, οι διακυμάνσεις των επιπέδων γλυκίνης ακολουθούν εκείνα της γλουταμίνης και του γλουταμινικού οξέος σε ηπατικές ασθένειες. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα επίπεδά της στην περίπτωση της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας, κατά την οποία τα επίπεδα γλυκίνης στον ορό μειώνονται (21). Αυτό το εύρημα μπορεί να σχετίζεται με το ρόλο αυτού του αμινοξέος ως ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή [125].

Γλουταμίνη και Γλουταμινικό οξύ

Η γλουταμίνη και το γλουταμινικό οξύ είναι αμινοξέα, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του αζώτου και την παραγωγή της αμμωνίας. Η γλουταμίνη είναι το πιο άφθονο αμινοξύ στο σώμα και αποτελεί τον κύριο μεταφορέα αζώτου μεταξύ των ιστών. Επιπλέον, η γλουταμίνη μετατρέπεται σε α -κετογλουταρικό, ένα κρίσιμο ενδιάμεσο του κύκλου του TCA (κύκλος του κιτρικού οξέος), συμβάλλοντας έτσι στη λειτουργία του κύκλου. Σε ασθενείς με ηπατικές παθήσεις, παρατηρείται συχνά αύξηση των επιπέδων γλουταμίνης στον ορό και στο πλάσμα.[125]. Όσον αφορά την ηπατική ίνωση, το γλουταμινικό ήταν το αμινοξύ που συσχετίστηκε πιο έντονα με τη σοβαρότητα της ίνωσης στην περίπτωση ασθενών με NAFLD [130].

Το γλουταμινικό οξύ διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των αμινοξέων στο ήπαρ, καθώς αποτελεί βασικό υπόστρωμα για τη σύνθεση της γλουταθειόνης και εμπλέκεται στον καταβολισμό των περισσότερων αμινοξέων [131]. Το γλουταμινικό εμπλέκεται επίσης στη σύνθεση γ -γλουταμυλοπεπτιδίων που παράγονται από τη σύζευξη γλουταμινικού με άλλα αμινοξέα, τα οποία έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με στεάτωση και στεατοηπατίτιδα[144]. Τα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος αλλά και της γλουταμίνης έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό, στο πλάσμα και στο ήπαρ στην περίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, της κίρρωσης και ανεπάρκειας ηπατικού μοσχεύματος[125]. Επιπλέον, ο ρόλος του μεταβολισμού αυτών των αμινοξέων στη λιπώδη διήθηση ήπατος μελετήθηκε σε πειραματικά μοντέλα NASH (αρουραίους) και σε ασθενείς με NASH. Σε αυτή την μελέτη όσο αυξανόταν η σοβαρότητα συσσώρευσης μωινοβλαστών και ίνωσης, τόσο αυξήθηκε και ο λόγος

γλουταμινικό οξύ προς γλουταμίνη στον ορό και το ήπαρ [145]. Το γλουταμινικό, ο λόγος γλουταμινικό προς γλουταμίνη και το α-κετογλουταρικό σχετίζονται με μείωση της παραγωγής γλουταθειόνης [124]. Όπως προαναφέρθηκε, το GSG index που πρότειναν οι Gaggini et al., και περιλαμβάνει το γλουταμινικό οξύ και την γλυκίνη ήταν ικανό να διαχωρίσει, ανάλογα με το στάδιο της ίνωσης τη στεάτωση και στεατοηπατίτιδα [131].

Πίνακας 3. Μεταβολικά μονοπάτια που διαταράσσονται και αντίστοιχοι μεταβολίτες

Μεταβολικά Μονοπάτια	Αντίστοιχοι Μεταβολίτες
Μεταβολισμός Πρωτεϊνών	Αμινοξέα (AAs), BCAAs, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη, Γλουταμίνη, Ασπαρτικό
Μεταβολισμός Αμινοξέων (BCAAs)	Βαλίνη, Λευκίνη, Ισολευκίνη, Γλουταμινικό, Σερίνη, Γλυκίνη
Μεταβολισμός Αρωματικών Αμινοξέων (AAAs)	Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη
Μεταβολισμός Γλυκόζης και Κύκλος TCA	Γλυκόζη, Γλυκογόνο, Γαλακτικό, Πυροσταφυλικό, Κιτρικό, Φουμαρικό, Σουκινικό Οξύ
Μεταβολισμός Γλουταθειόνης	Γλουταμινικό, Κυστεΐνη, Γλυκίνη, Σερίνη, Μεθειονίνη, Βεταΐνη

3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ - LIPIDOMICS ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

3.1 Εισαγωγή- Κατηγορίες λιπιδίων

Τα λιπίδια αποτελούν μία ετερογενή ομάδα ενώσεων, οι οποίες είναι (σχεδόν) αδιάλυτες σε υδατικό διάλυμα και διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Με βάση τη χημική δομή τους, τα λιπίδια ταξινομούνται σε 8 κατηγορίες (Πίνακας 4). Με βάση την πολικότητά τους διαχωρίζονται στα ουδέτερα και στα πολικά λιπίδια. Επιπλέον, με βάση τη δυνατότητα να υδρολυθούν ταξινομούνται στα σύνθετα λιπίδια, που υδρολύονται σε απλούστερες ενώσεις και στα απλά λιπίδια που δεν υδρολύονται [146].

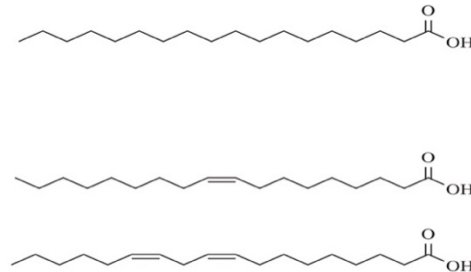
Πίνακας 4. Κατηγορίες λιπιδίων.

A.A.	Κατηγορίες Λιπιδίων
1	Λιπαρά Οξέα (Fatty acyls, FA)
2	Γλυκερολιπίδια ή Γλυκερίδια (Glycerolipids, GL)
3	Γλυκεροφωσfolιπίδια (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 φωσfolιπίδια και τα λιπαρά οξέα.

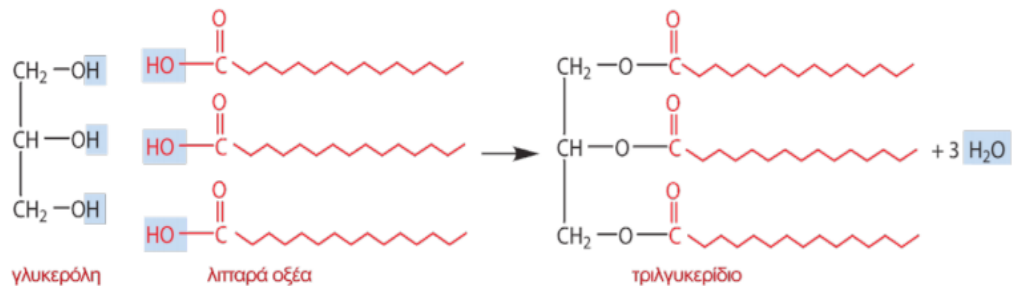
Τα λιπαρά οξέα είναι γραμμικά αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα που είτε βιοσυνθέτουν οι οργανισμοί είτε προσλαμβάνονται με τη διατροφή. Λόγω του μηχανισμού βιοσύνθεσής τους έχουν πάντα ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα. Ανάλογα με την παρουσία διπλού δεσμού,

χωρίζονται σε κορεσμένα (χωρίς διπλούς δεσμούς) και ακόρεστα λιπαρά οξέα (που περιέχουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς, κυρίως cis και σπάνια trans γεωμετρία). Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα με ένα διπλό δεσμό αποκαλούνται μονοακόρεστα, ενώ αυτά με δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς αποκαλούνται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Εικόνα 6).



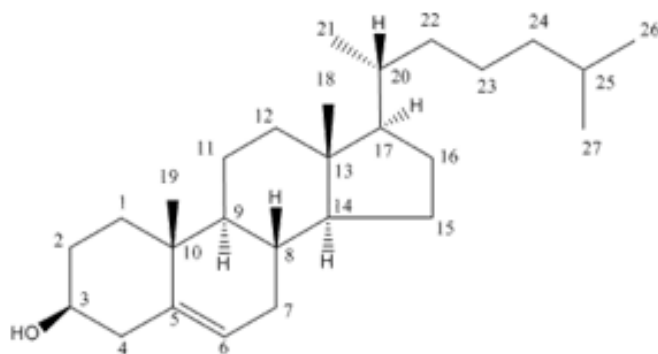
Εικόνα 6 Εικόνα λιπαρών οξέων

Τα γλυκερολιπίδια ή γλυκερίδια είναι εστέρες που παράγονται, όταν η γλυκερόλη αντιδρά με μονοκαρβοξυλικά οξέα. Λόγω των τριών υδροξυλομάδων (OH) της γλυκερόλης, υπάρχουν μονοεστέρες, διεστέρες και τριεστέρες γλυκερολιπιδίων. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν τριεστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα και αποτελούν τα πιο άφθονα γλυκερίδια στο πλάσμα. Είναι απλά τριγλυκερίδια, όταν περιέχουν το ίδιο λιπαρό οξύ και μικτά τριγλυκερίδια, όταν περιέχουν δύο ή τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα (βλ. Εικόνα 7).



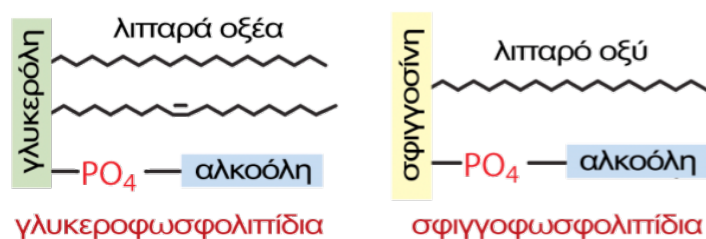
Εικόνα 7 Εικόνα ενός γλυκεριδίου

Τα στεροειδή λιπίδια αποτελούν λιπίδια που έχουν ως βασικό σκελετό το σύστημα των τεσσάρων δακτυλίων. Το πιο σημαντικό στεροειδές στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η χοληστερόλη (Εικόνα 8). Τα λιπίδια αυτά μαζί με τα γλυκεροφωσfolιπίδια και τη σφιγγομυελίνη είναι τα καίρια δομικά συστατικά της λιπιδικής μεμβράνης.



Εικόνα 8: Το μόριο της ελεύθερης χοληστερόλης

Τα φωσφολιπίδια αντιπροσωπεύουν μία σημαντική ομάδα λιπιδίων και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα γλυκεροφωσφολιπίδια και τα σφιγγολιπίδια. Ο βασικός σκελετός των πρώτων είναι η αλκοόλη γλυκερόλη, ενώ των σφιγγολιπιδίων είναι η σφιγγοσίνη. Και τα δύο συνδέονται με ένα ή δύο λιπαρά οξέα και μια φωσφορική ομάδα, στην οποία συνδέεται μία αλκοόλη (βλ. Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Μόριο-γλυκεροφωσφολιπιδίου και σφιγγολιπιδίου

Τα λιπίδια συμμετέχουν σε πλήθος λειτουργιών και κατέχουν σημαντικό ρόλο στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, στην αποθήκευση ενέργειας και στη σύνθεση προσταγλανδινών, ορμονών και χολικών οξέων. Ακόμη, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η κυτταρική αύξηση αλλά και η μετάδοση σημάτων είναι σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, στις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι τα λιπίδια συμμετέχουν ενεργά. Διαταραχές στο μεταβολισμό και στη σύνθεση των λιπιδίων έχουν συσχετιστεί με μια σειρά σημαντικών παθήσεων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η παχυσαρκία, η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος και ο καρκίνος. Συνεπώς, η λεπτομερής μελέτη της σύστασης των λιπιδίων στο αίμα προσφέρει τη δυνατότητα όχι μόνο της κατανόησης των παθοφυσιολογικών μηχανισμών των παθήσεων, αλλά δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αξιόπιστων δεικτών για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της νόσου [147].

3.2 Lipidomics

Τα Lipidomics αποτελούν ένα διακριτό πεδίο της μεταβολομικής (Metabonomics) με αντικείμενο τη μελέτη των λιπιδίων, δηλαδή μιας κατηγορίας από το σύνολο των μεταβολιτών που παρατηρούνται σε ένα οργανισμό, χρησιμοποιώντας κατάλληλες αναλυτικές τεχνικές [148,149]. Ο όρος "lipidome" χρησιμοποιείται, για να περιγράψει το σύνολο των λιπιδίων που περιέχονται σε ένα κύτταρο, έναν ιστό, ή έναν οργανισμό [150]. Με αυτήν την προσέγγιση, είναι δυνατή η μελέτη της δομής και της λειτουργίας των λιπιδίων, καθώς και της αλληλεπίδρασής τους με άλλα λιπίδια, πρωτεΐνες και μεταβολίτες [149,151]. Επίσης, η μελέτη του λιπιδικού προφίλ επιτρέπει την αναγνώριση διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων αλλά και σηματοδοτικών μονοπατιών, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής ομοιοστασίας, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις [149,151].

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 και επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση όλων των λιπιδίων που υπάρχουν σε ένα δείγμα [149,152,153]. Παρόλα αυτά, αυτές οι πειραματικές διαδικασίες με τις παραπάνω μεθόδους είναι συχνά χρονοβόρες και απαιτούν πολλά βήματα προεπεξεργασίας, καθιστώντας τις ακατάλληλες για την καθημερινή κλινική πράξη.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^1H NMR) αποτελεί μια ευαίσθητη πυρηνική αναλυτική τεχνική με πολλές εφαρμογές στις βιοϊατρικές επιστήμες. Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βασίζεται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Η φασματοσκοπία ^1H NMR παρέχει γρήγορη και συνολική ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων ενός δείγματος με ελάχιστη ή καθόλου προεπεξεργασία.

3.3 Ανάλυση της λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι λιποπρωτεΐνες ή λιποπρωτεϊνικά σωματίδια είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων (χοληστερόλης, εστέρων της χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων) και πρωτεϊνών που ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες. Οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ή HDL λιποπρωτεΐνες (High Density Lipoproteins) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων, που διαφέρουν ως προς την πυκνότητα, το μέγεθος, την 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 [154]. Όπως οι υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες αποτελούνται από ένα 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.

Με βάση την πυκνότητά τους, τα HDL σωματίδια διαχωρίζονται σε δυο κύρια υποκλάσματα: HDL₂ (1.063–1.125 g/mL) και HDL₃ (1.125–1.21 g/mL) [155]. Με βάση το μέγεθος έχουν προσδιοριστεί με ηλεκτροφόρηση τα παρακάτω υποκλάσματα: HDL_{2b} (9.7–12.0 nm), HDL_{2a} (8.8–9.7 nm), HDL_{3a} (8.2–8.8 nm), HDL_{3b} (7.8–8.2 nm), HDL_{3c} (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) [156,157]. Επιπλέον, με βάση το σχήμα των σωματιδίων διακρίνονται τα σφαιρικά HDL(α-HDL) και τα preβ-HDL σωματίδια που έχουν δισκοειδές σχήμα [157].

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 οξείας 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 [154].

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% [154,158].

Πίνακας 5 Λιπιδικά συστατικά των HDL Λιποπρωτεϊνών (Πηγή: Kontush A, et al. *J Lipid Res.* 2013;54(11):2950–63)[158]

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
Φωσφατιδυοϊνοσιτόλη	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 [159]. 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 [160,161].

Τα τελευταία χρόνια πλήθος μελετών έχει εξετάσει τις αλλαγές στη λιπιδική σύνθεση των HDL λιποπρωτεϊνών σε παθολογικές καταστάσεις [162–166]. Μάλιστα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η σύσταση των HDL σε φωσφολιπίδια αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη διαδικασία της αναστροφής μεταφοράς της χοληστερόλης [167,168]. Ακόμη, οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας υφίστανται δομικές αλλαγές που ελέγχονται από διάφορους μηχανισμούς, όπως είναι η οξείδωση και η γλυκίωση. Αυτές οι αλλαγές στη δομή επηρεάζουν τις ιδιότητες του σωματιδίου και πιθανόν οδηγούν στην απώλεια λειτουργικότητάς του [169]. Έχει παρατηρηθεί ότι η χρόνια φλεγμονή, που θεωρείται παράγοντας κινδύνου για την καρδιαγγειακή νόσο, μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των φωσφολιπιδίων και να προκαλέσει αλλαγές στις πρωτεΐνες των HDL, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του σωματιδίου [170]. Συνοψίζοντας, η ανάλυση της συνολικής σύστασης των λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών μπορεί να συμβάλει στην αποκάλυψη των συστατικών των λιπιδίων που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία του σωματιδίου και συμμετέχουν σε παθογενετικούς μηχανισμούς διάφορων παθήσεων.

3.4 Lipidomics και NAFLD

Οι πρώτες μελέτες για τη διερεύνηση του λιπιδικού προφίλ σε ασθενείς με NAFLD, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 6, διενεργήθηκαν σε βιοψίες ήπατος και αφορούσαν κυρίως την ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων. Από τα πρώτα ευρήματα στις μελέτες αυτές ήταν η αύξηση του λόγου ω-6/ ω-3 των λιπιδίων σε ασθενείς με NAFLD, αλλά και η ελάττωση των μακράς αλύσου ω-3 και ω-6 PUFA των τριγλυκεριδίων, όπως το αραχιδονικό, το εικοσαπεντανοϊκό και εικοσιδιεξανοϊκό οξύ [171]. Μείωση των μακράς αλύσου ω-3 και ω-6 PUFA διαπιστώθηκε και σε μεταγενέστερη μελέτη σε ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα [172]. Μάλιστα, η μείωση αυτή ήταν ανεξάρτητη από τη διαιτητική πρόσληψη αυτών των λιπιδίων και συνεπώς μία διαταραχή στα βιοσυνθετικά μονοπάτια αυτών των λιπιδίων είναι πιθανά παρούσα στη λιπώδη διήθηση του ήπατος [172]. Πράγματι, αργότερα φάνηκε πως η δραστηριότητα της Δ5 δεσатуράσης, ενός βασικού ενζύμου στη βιοσύνθεση ω -3 και ω-6 λιπαρών οξέων, είναι ελαττωμένη στους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος [173]. Ωστόσο, η πιο ολοκληρωμένη και αναλυτική μελέτη λιπιδικής σύστασης σε βιοψίες ήπατος ασθενών με NAFLD πραγματοποιήθηκε αργότερα και περιλάμβανε την ποσοτικοποίηση όλων των βασικών κατηγοριών των λιπιδίων [174]. Οι αξιοσημείωτες διαφορές που παρατηρήθηκαν σε αυτή την ανάλυση δεν αφορούσαν μόνο τη σύσταση των λιπαρών οξέων αλλά και αυτή των φωσφολιπιδίων. Μάλιστα, αλλαγές στο προφίλ των φωσφολιπιδίων έχουν περιγραφεί σε βιοψίες ήπατος ασθενών με πιο προχωρημένη νόσο, όπως ιστολογικά επιβεβαιωμένη στεατοηπατίτιδα [173]. Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζουν κάποιου βαθμού διαταραχή στη βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων και πιθανά σχετίζονται με την εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα [173].

Μελέτες της λιπιδικής σύστασης ακολούθησαν όμως αργότερα και σε δείγματα πλάσματος και ορού ασθενών με NAFLD. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το ήπαρ είναι το κύριο όργανο του μεταβολισμού και ότι τα λιπίδια του ορού νηστείας αντικατοπτρίζουν κυρίως τα λιπίδια που προέρχονται από το ήπαρ, οι αλλαγές στο προφίλ των κυκλοφορούντων λιπιδίων θα μπορούσαν να συσχετιστούν με αυτές στο ήπαρ κατά την εξέλιξη της NAFLD. Ωστόσο, οι αλλαγές της λιπιδικής σύστασης των λιπαρών οξέων και των φωσφολιπιδίων στο πλάσμα διέφεραν από αυτές που είχαν αναφερθεί σε βιοπτικά δείγματα [175,176]. Επιπλέον, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, αν και έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες στον ορό ή πλάσμα των ασθενών με NAFLD, έχουν περιγραφεί αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σύμφωνα με τον Puri et al, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις υποκατηγορίες φωσφολιπιδίων του πλάσματος ασθενών με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα των υγιών [176]. Αντίθετα, μεταγενέστερες μελέτες κάνουν λόγο για στατιστικά σημαντικές αλλαγές στη σύσταση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), της φωσφατιδυλινοσιτόλης

(PI), της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και της σφιγγομυελίνης μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με NAFL και NASH [175,177].

Πίνακας 6 Ευρήματα μελετών σε βιοψίες ήπατος ασθενών με NAFLD με Lipidomics προσέγγιση

Ref.	Βιολογικό Δείγμα	Κύρια ευρήματα σε ασθενείς με NAFL σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.	Κύρια ευρήματα σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.
Puri et al [174], 2007	Ήπαρ	Αύξηση: DAG, TAG, ολικά SFA, ολικά PUFA; σταδιακή αύξηση της μέσης τιμής του λόγου TAG/DAG, FC/PC και ηπατικής FC από φυσιολογικό ήπαρ, NAFL και NASH. Μείωση: Ολική PC και σε NAFL σε NASH; AA στα FFA, TAG, και PC σε NASH; EPA και DHA των TAG σε NASH.	Αύξηση του λόγου n-6: n-3 FFA σε ασθενείς με NASH
Araya et al [171], 2004	Ήπαρ, λιπώδης ιστός (σύσταση λιπαρών οξέων)	Αύξηση: n-6:n-3 λόγου, n-6 LCPUFA σε ηπατικά φωσφολιπίδια, ολικά MUFA. Μείωση: Long-chain PUFA of the n-6 and n-3 series in liver TAG, AA/LA ratio, EPA + DHA)/ALA in liver TAG, n-3 LCPUFA in phospholipids, total PUFA, n-3 PUFA, n-6 PUFA, AA, EPA, DHA.	Αύξηση του λόγου n-6: n-3 FFA σε ασθενείς με NASH
Allard et al [172], 2008	Ήπαρ, ερυθροκύτταρα (σύσταση λιπαρών οξέων)	Αύξηση: MUFAs, palmitoleic acid (16:1 n9), and oleic acid (18:1 n9) in NASH compared to control group. Μείωση: Ολικά n-3 PUFA, μακράς αλύσου n-3 (EPA + DHA) και μακράς αλύσου n - 6 (AA) PUFA σε NASH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, RBC-FA composition similar among the three groups.	Μείωση: Ολική n- 6- PUFA σε NASH σε σύγκριση με NAFL
Chiappini et al [173], 2017	Ήπαρ	Αύξηση: C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:1n-7, C18:1n-9, and C18:2n-6 in NASH. Μείωση: Ολικά SM, PI, PS, PE, PC σε NASH.	Λιπιδική υπογραφή σε NASH (32 λιπίδια). Μείωση: AA, EPA, και DHA; Ολικά Cer.

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease, NAFL: Nonalcoholic fatty liver; NASH: Nonalcoholic steatohepatitis; DAG: Diacylglycerol; TAG: Triacylglycerol; SFA: Saturated Fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids; FC: Free cholesterol; PC: Phosphatidylcholine; FFA : Free fatty acids; LCPUFA: Long chain polyunsaturated fatty acid; MUFA: Monounsaturated fatty acid; RBC-FA: Red blood cell-fatty acids; SM: Sphingomyelin; PI: Phosphatidylinositol; PS: Phosphatidylserine; PE: Phosphatidylethanolamine; EPA: Eicosapentaenoic acid (C20:5n-3); DHA: Docosahexanoic acid (C22:6n-3); AA: Arachidonic acid (C20:4n-6); LA: Linoleic acid (C18:2n-6); ALA: α -linolenic acid (C18:3n-3); Cer: Ceramides.

Λόγω της ασυμφωνίας μεταξύ των ευρημάτων των αναλύσεων του ορού και της ανάγκης ανεύρεσης νέων μη επεμβατικών βιοδεικτών για το διαχωρισμό της NASH από τη NAFL, ακολούθησαν μελέτες λιπιδικής ανάλυσης ταυτόχρονα σε δείγματα πλάσματος και σε δείγματα βιοψίας ήπατος [178,179]. Εντοπίστηκαν συνολικά 48 λιπίδια με επικάλυψη τόσο στο πλάσμα όσο και σε δείγματα ήπατος ασθενών με NAFLD. Αυτά ήταν κυρίως είδη σφιγγολιπιδίων, όπως διυδροκεραμίδια, 1-δεξοδιυδροκεραμίδια και μεγάλης αλύσου κεραμίδια, προτείνοντας ότι διαταραχή στον μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου [178].

Γλυκεροφωσφολιπίδια

Τα γλυκεροφωσφολιπίδια αποτελούν κύρια συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και πηγή ενώσεων με ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Χρησιμεύουν ως σηματοδοτικά μόρια αλλά και ως θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες. Η φωσφατιδυλοχολίνη στα θηλαστικά αποτελεί ένα από τα πιο άφθονα φωσφολιπίδια και αποτελεί σημαντικό συστατικό της λιπιδικής κυτταρικής μεμβράνης. Σε βιοψίες ήπατος ασθενών με λιπώδες ήπαρ έχει αναφερθεί μείωση των επιπέδων της φωσφατιδυλοχολίνης, αλλά τα αποτελέσματα στον ορό των ασθενών αυτών είναι αντικρουόμενα [173–177].

Στα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών, η PC παράγεται *de novo* από τη χολίνη της διατροφής μέσω του μονοπατιού της cytidine 5'-diphosphate CDP-choline [180]. Στα ηπατοκύτταρα, έως και 30% της PC προέρχεται από τη μετατροπή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) σε PC, μέσω αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο φωσφατιδυλαιθανολαμίνη N-μεθυλτρανσφεράση (PEMT) [181]. Η σύνθεση της PE πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της CDP-ethanolamine και μέσω αποκαρβοξυλίωσης της φωσφατιδυλοσερίνης. Μέχρι πρότινος, ένας μικρός αριθμός μελετών έχει αναφέρει αλλαγές της σύστασης της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης σε ασθενείς με λιπώδες ήπαρ. Η περιεκτικότητα του ήπατος σε PE έχει αναφερθεί πως είναι μειωμένη σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα, ενώ στην ίδια κατηγορία των ασθενών σύμφωνα με άλλη μελέτη τα επίπεδα ορού της PE βρέθηκαν αυξημένα [173,177].

Ο λόγος φωσφατιδυλοχολίνη/φωσφατιδυλαιθανολαμίνη στο ήπαρ είναι δείκτης δραστηριότητας του ενζύμου PEMT [182]. Σε μία ανάλυση λιπιδικής σύστασης με φασματοσκοπία μάζας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ηπατικού λόγου PC/PE σε ασθενείς με NAFLD [182]. Ομοίως, χαμηλός λόγος PC/PE έχει επίσης βρεθεί σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με NAFLD και θεωρείται βιοδείκτης της νόσου [182].

Επιπλέον, πολυμορφισμός του PEMT που οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης NAFLD [183]. Ωστόσο, όταν αυτή η παράμετρος μελετήθηκε στο πλάσμα των ασθενών, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους υγιείς, στους ασθενείς με απλή στεάτωση και σε αυτούς με στεατοηπατίτιδα, υποδηλώνοντας πως άλλοι αντιρροπιστικοί μηχανισμοί πιθανά ενεργοποιούνται για τη διατήρηση του λόγου PC/PE στο πλάσμα [175].

Η μειωμένη ηπατική σύσταση σε PC και ο χαμηλός ηπατικός λόγος PC/PE φαίνεται να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη της NAFLD, αλλά οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί λιποτοξικότητας δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι το μόνο φωσφολιπίδιο που είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τη συναρμολόγηση και την έκκριση των λιποπρωτεϊνών [184]. Τα χαμηλά ηπατικά επίπεδα της PC, λόγω διαταραχής της σύνθεσής της έχει βρεθεί πως εμποδίζουν την έκκριση των VLDL λιποπρωτεϊνών και μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των κυκλοφορούντων VLDL λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Συνεπώς, διαταραχή στην έκκριση των VLDL οδηγεί σε συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες με ζωικά μοντέλα [184,185]. Επιπροσθέτως, τα χαμηλά επίπεδα της PC ενεργοποιούν την πρωτεΐνη sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) [186]. Η ενεργοποίηση της SREBP1 προκαλεί την αυξημένη έκφραση λιπογενετικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την αύξηση της *de novo* λιπογένεσης και την εμφάνιση λιπώδους ήπατος [186].

Πέρα από τις μεταβολικές επιδράσεις, οι αλλαγές στις ηπατικές συγκεντρώσεις της PC και της PE πιθανά επηρεάζουν και τη δομή της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας των κυτταρικών μεμβρανών. Η PC έχει κυλινδρικό σχήμα και κατανέμεται κυρίως στην εξωτερική στοιβάδα της μεμβράνης. Αντίθετα, η δομή της PE χαρακτηρίζεται ως κωνοειδής και εντοπίζεται κυρίως στην εσωτερική στιβάδα [187]. Ο χαμηλός λόγος PC/PE πιθανά οδηγεί σε αναδιαμόρφωση της διπλοστιβάδας με κατανομή της PE περισσότερο στην εξωτερική στιβάδα. Οι αλλαγές αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια ακεραιότητας των μεμβρανών και την αυξημένη διαπερατότητα σε προφλεγμονώδη μόρια, όπως οι κυτοκίνες. Συνεπώς, η απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών, όπως του ασβεστίου, σε συνδυασμό με την αυξημένη είσοδο κυτταροκινών, επάγει τη φλεγμονή που χαρακτηρίζει τη νόσο [188].

Σε ό,τι αφορά τα υπόλοιπα γλυκεροφωσφολιπίδια, στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους έχουν παρατηρηθεί σε μικρό αριθμό μελετών. Ομοίως, όπως και με τα υπόλοιπα γλυκεροφωσφολιπίδια τα ευρήματα από μελέτες σε ηπατικά δείγματα δεν συμφωνούν με αυτά από το πλάσμα των ασθενών.

Σύμφωνα με την μελέτη των Chiappini et al. σε βιοψίες ασθενών με NASH έχουν αναφερθεί χαμηλά επίπεδα φωσφατιδυλοσερίνης και φωσφατιδυλινοσιτόλης, ενώ σε πιο πρόσφατη

μελέτη δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στα επίπεδα τους ανάμεσα στους υγιείς, ασθενείς NAFL και ασθενείς με NASH [173,179]. Στο πλάσμα αντιθέτως έχει αναφερθεί αύξηση της PS και PI σε NAFL και NASH ασθενείς, ενώ από άλλους μόνο η PI πλάσματος ήταν αυξημένη στους ασθενείς με στεατοηπατίτιδα [175,189]. Ωστόσο, στη μελέτη των Tiwari- Heckler et al, δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα αυτών των λιπιδίων, αλλά αξίζει να σημειωθεί πως δεν διενεργήθηκε βιοψία σε όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη [177]. Η PS και η PI αποτελούν και αυτές δομικά στοιχεία των μεμβρανών και σχετίζονται με μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης και κυτταρικής απόπτωσης [190,191]. Συνεπώς, διαφορές στην ηπατική συγκέντρωση και στα επίπεδά τους στο πλάσμα πιθανά συμμετέχουν στην εμφάνιση και πρόοδο της NAFLD.

Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) είναι ένα βιολογικά ενεργό λιπίδιο και θεωρείται ένας σημαντικός διαμεσολαβητής της ηπατικής λιποτοξικότητας [192]. Σε βιοψίες ασθενών με NASH, η LPC έχει ανευρεθεί αυξημένη και μάλιστα η αύξηση αυτή αντανακλά τη βαρύτητα της νόσου [174,193]. Ωστόσο, σε μελέτες πλάσματος και ορού δεν διαπιστώθηκαν αλλαγές στα επίπεδα της LPC σε ασθενείς με NAFL και NASH [175–177]. Αντιθέτως, σε άλλη μελέτη αναφέρεται σημαντική μείωση των επιπέδων συγκεκριμένων LPC λιπιδίων στον ορό ασθενών με στεατοηπατίτιδα και σε άλλη μείωση των επιπέδων της LPC ορού σε ασθενείς με NAFLD [139,194]. Μάλιστα, η σημαντική μείωση της LPC σε συνδυασμό με αύξηση των τριγλυκεριδίων βραχείας αλύσου και διπλού δεσμού και μείωση των αιθερικών φωσφολιπιδίων έχουν προταθεί ως χρήσιμος δείκτης εκτίμησης του ποσοστού λίπους σε ασθενείς με NAFLD.

Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη παράγεται από τη φωσφατιδυλοχολίνη με τη δράση της εκκριτικής ή δεσμευμένης σε λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάσης A2 (PLA2). Επιπλέον, η LPC πλάσματος προέρχεται και από την δράση της ακυλοτρανσφεράσης LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) αλλά και από τη δράση της ενδοθηλιακής λιπάσης. Η ηπατική έκκριση θεωρείται επίσης πηγή της LPC πλάσματος [195]. Η αύξηση της περιεκτικότητας του ήπατος σε LPC μπορεί να αποδοθεί είτε σε αύξηση της ηπατικής βιοσύνθεσης της LPC είτε σε αυξημένη μεταφορά της συνολικής LPC στο ήπαρ μέσω της αλβουμίνης ή της alpha 1-acid glycoprotein AGP [196]. Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα της LPC στο πλάσμα, μία διαταραχή στις ενζυμικές δραστηριότητες της LCAT ή της PLA2 θα μπορούσαν να αποτελέσουν την αιτία για τα χαμηλά επίπεδα της. Ακόμη, αυξημένη μετατροπή της LPC σε PC ή λυσοφωσφατιδικό οξύ και 1-φωσφορική σφιγγοσίνη θα μπορούσε να εξηγήσει και αυτή τα μειωμένα επίπεδα της LPC. Μάλιστα, τα επίπεδα της PLA2 έχουν βρεθεί ελαττωμένα στους ασθενείς με NAFLD ενώ η δραστηριότητα της LCAT έχει βρεθεί αυξημένη σε ασθενείς με πιθανή NAFLD με βάση το Fatty Liver Index > 60 [197,198]. Σε μελέτη σε αρουραίους διαπιστώθηκαν χαμηλότερα επίπεδα παλμιτοϋλ-, στεαροϋλ-, και ολεοϋλ -λυσοφωσφατιδυλοχολινών (LPCs) στη NASH σε σύγκριση με τους αρουραίους με NAFL και η δραστηριότητα της λύσο-PC

ακυλοτρανσφεράσης, που καταλύει τη μετατροπή των LPCs σε PC, βρέθηκε αυξημένη στη NASH [199].

Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη είναι ένα δραστικό βιολογικά λιπίδιο το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου και στην εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα. Η LPC επηρεάζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και έχει βρεθεί πως μειώνει την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν την οξείδωση των λιπαρών οξέων, ενώ ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης [200]. Επιπλέον, *in vitro* έχει διαπιστωθεί πως η LPC προκαλεί απόπτωση των ηπατοκυττάρων πιθανά μέσω βλάβης της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων, ενώ οι αναστολείς της φωσφολιπάσης A2 μειώνουν την λιποτοξικότητα και την απόπτωση [200,201]. Τέλος, η λιποτοξικότητα που προκαλείται από την LPC μπορεί να μεσολαβείται από την απελευθέρωση προφλεγμονωδών και προ-ινωτικών μορίων από τα ηπατοκύτταρα ή από την αυξημένη μετατροπή της LPC στο προ-ινωτικό λυσοφωσφατιδικό οξύ [202].

Τα πλασμαλογόνα είναι μία κατηγορία γλυκεροφωσφολιπιδίων, των οποίων η βιοσύνθεση είναι μία πολύπλοκη, πολλαπλών σταδίων διεργασία που πραγματοποιείται στα υπεροξεισωμάτια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο [203]. Τα κυκλοφορούντα πλασμαλογόνα του πλάσματος έχουν βρεθεί ελαττωμένα σε ασθενείς με NASH και τα επίπεδά της έχουν αρνητική συσχέτιση με την παχυσαρκία [204,205]. Ακόμη, ελαττωμένα έχουν βρεθεί και τα συνολικά αιθερικά φωσφολιπίδια στους ασθενείς με NAFLD [194]. Ωστόσο, αυτές οι αλλαγές δεν έχουν παρατηρηθεί και στις βιοψίες ήπατος των ασθενών με NAFLD. Αυτό πιθανά οφείλεται στις σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις αυτών των λιπιδίων στο ήπαρ σε σύγκριση με τα υπόλοιπα γλυκεροφωσφολιπίδια [206]. Το ήπαρ διαθέτει χαμηλούς τίτλους πλασμαλογόνων, αλλά τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους είναι ενεργά στο ήπαρ. Συνεπώς, η χαμηλή περιεκτικότητα του ήπατος σε πλασμαλογόνα μπορεί να αποδοθεί στη σύνθεση και επακόλουθη μεταφορά σε άλλους ιστούς με τις λιποπρωτεΐνες [206]. Μάλιστα, ασθενείς με τον GG-γονότυπο του PNPLA3, οι οποίοι διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο για προχωρημένη νόσο και ίνωση, παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα ολικών πλασμαλογόνων στο πλάσμα σε σχέση με ασθενείς με CC- και CG- αλληλίο [177].

Τα πλασμαλογόνα αποτελούν καίρια δομικά στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης και πιθανά συμμετέχουν στη μεταφορά ιόντων και χοληστερόλης από και προς το κύτταρο. Ακόμα, έχουν χαρακτηριστεί ως σηματοδοτικά μόρια αλλά και ως πρόδρομες ουσίες της βιοσύνθεσης των εικοσανοειδών [207]. Επίσης, μέσω του βινυλαιθέρα που διαθέτουν αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως λειτουργούν ως ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες [208]. Συνεπώς, η μείωση των πλασμαλογόνων στο πλάσμα ασθενών με NASH μπορεί να αποδοθεί στη βλάβη των υπεροξεισωμάτων από το οξειδωτικό στρες και την επακόλουθη διαταραχή σύνθεσης πλασμαλογόνων [203]. Αξιοσημείωτο είναι δε, πως μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι τα

ενδογενή ηπατικά πλασμαλογόνα, μέσω μηχανισμού που εξαρτάται από τον PPAR- α , αποτρέπουν την ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης και NASH σε αρουραίους [209].

Σφιγγολιπίδια

Τα σφιγγολιπίδια είναι μία ειδική κατηγορία φωσφολιπιδίων που περιέχουν μία σφιγγοσίνη συνδεδεμένη σε μια αλυσίδα λιπαρών οξέων. Αν και τα σφιγγολιπίδια ανευρίσκονται σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις από ότι τα υπόλοιπα γλυκεροφωσφολιπίδια, θεωρούνται σημαντικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών [210,211]. Συμμετέχουν στη διάταξη και οργάνωση μεμβρανικών επιτόπων και στην σηματοδότηση σημαντικών βιολογικών διεργασιών, όπως η επιβίωση του κυττάρου και η ανοσιακή απάντηση [211]. Μελέτες λιπιδικής σύστασης αναγνώρισαν διαφορές στα επίπεδα της σφιγγομυελίνης (SM), των κεραμιδίων και διυδροκεραμιδίων στο πλάσμα και σε ηπατικά δείγματα ασθενών με NAFL και NASH. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι αλλαγές στον μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων σχετίζονται στενά με την ανάπτυξη αλλά και τη βαρύτητα της NAFLD[139,173,178]

Η σφιγγομυελίνη είναι το πιο άφθονο σφιγγολιπίδιο και τα επίπεδά της στο πλάσμα έχουν συσχετιστεί με το ΔΜΣ [205,210]. Εντούτοις, στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, οι μελέτες λιπιδικής ανάλυσης ήπατος αλλά και πλάσματος δε συμφωνούν μεταξύ τους σε ό,τι αφορά τα επίπεδα της σφιγγομυελίνης. Συγκεκριμένα, σε βιοψίες NASH ασθενών η SM ήταν μειωμένη, αλλά οι Puri *et al* δεν διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της [173,174]. Ακόμη, σε άλλες μελέτες που η ομάδα ελέγχου ήταν παχύσαρκοι ασθενείς δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου, στους ασθενείς με NAFL και NASH [175,179,189]. Αντίθετα, οι Tiwari- Heckler *et al*, ανέφεραν αύξηση της ολικής SM ορού σε NAFL και NASH ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου[177]. Επιπλέον, συγκεκριμένα είδη σφιγγομυελίνης, όπως SM (36:3), (d18:2/16:0), (d18:2/14:0), (d18:1/18:0), (d18:1/16:0), (d18:1/12:0) και (d18:0/16:0) έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό ασθενών με NAFLD σε σχέση με τους υγιείς[212]. Από την άλλη, οι Zhou *et al*, ανέφεραν πως μία ομάδα ειδών σφιγγομυελίνης που αποτελούνταν κυρίως από SM (d18:1/24:1), SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/22:0), SM (d18:1/24:0), SM (d18:1/18:0), SM (d18:1/20:0), SM (d18:1/23:0), SM (d18:0/16:0), and SM (d18:0/20:4) ήταν μειωμένη στους ασθενείς με στεατοηπατίτιδα σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς NASH[139]. Τελικά, αν και οι ερευνητές δεν έχουν καταλήξει αν η SM αυξάνεται ή μειώνεται με την βαρύτητα της νόσου, μελέτες σε γενετικά τροποποιημένους αρουραίους που παρουσίαζαν έλλειψη του γονιδίου της συνθετάσης της

σφιγγομυελίνης ανέδειξαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ επιπέδων ηπατικής SM και αντίστασης στην ινσουλίνη [213]. Συνεπώς, τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν υπέρ επιπλέον έρευνας στη σχέση μεταξύ του μεταβολισμού της σφιγγομυελίνης και της προόδου της NAFLD.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει πρόσφατα αναδείξει τον σημαντικό ρόλο που κατέχουν τα κεραμίδια στην αντίσταση στην ινσουλίνη [214]. Τα κεραμίδια και τα σφιγγολιπίδια προερχόμενα από κεραμίδια αποτελούν καίρια δομικά στοιχεία των κυτταρικών μεμβρανών, τα οποία όμως διαθέτουν και ιδιότητες κυτταρικής σηματοδότησης. Αν και η σύνθεση των κεραμιδίων πραγματοποιείται σε πολλά όργανα, το ήπαρ αποτελεί κεντρικό ιστό σύνθεσης κεραμιδίων και πλήθος μελετών υποδηλώνει πως σφιγγολιπίδια, όπως η SM και τα κεραμίδια, βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο ήπαρ σε σχέση με άλλους ιστούς [214,215]. Σε ό,τι αφορά τις μελέτες λιπιδικής ανάλυσης, τα επίπεδα κεραμιδίων αυξάνονται στο πλάσμα ασθενών με προδιαβήτη, αλλά αυξημένα έχουν βρεθεί και στο πλάσμα και τις ηπατικές βιοψίες ασθενών με NAFLD [178,189,216].

Υπάρχουν 3 διαφορετικά μονοπάτια για την σύνθεση των κεραμιδίων.

- (1) Ένα *de novo* μονοπάτι που περιλαμβάνει αντιδράσεις που καταλύονται από τρανσφεράση της σερίνης παλμιτουλ- CoA (SPT),
- (2) Το μονοπάτι της υδρόλυσης της SM, αντίδραση που καταλύεται από την σφιγγομυελινάση (SMase) και τέλος
- (3) Μονοπάτι περίσωσης [217].

Η *de novo* σύνθεση έχει βρεθεί πως ενεργοποιείται από μία δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά [218]. Επιπλέον, η αυξημένη εισροή ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ, η ενεργοποίηση της φλεγμονής μέσω TNFα and IL1 αλλά και το οξειδωτικό στρες μπορούν να αυξήσουν τη δραστηριότητα της SPT και να ενεργοποιήσουν την *de novo* σύνθεση των κεραμιδίων [214,217]. Και οι τρεις αυτές καταστάσεις συμμετέχουν στην αιτιοπαθογένεια της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος και φαίνεται να είναι οι κύριοι μηχανισμοί ρύθμισης της *de novo* σύνθεσης των κεραμιδίων [103,214]. Η φλεγμονή δεν ενεργοποιεί μόνο το μονοπάτι της *de novo* σύνθεσης αλλά ενεργοποιεί και την σφιγγομυελινάση [219]. Η αδιπνεκτίνη, μία αδιποκίνη που ενέχεται στην παθοφυσιολογία της NAFLD, φαίνεται να επηρεάζει και αυτή τα επίπεδα κεραμιδίων. Συγκεκριμένα, η αδιπνεκτίνη μέσω υποδοχέων ενεργοποιεί την έκφραση της κεραμιδάσης, ενζύμου που μετατρέπει τα κεραμίδια σε σφιγγοσίνη-1-φωσφατάση (S1P). Οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα αδιπνεκτίνης σε σχέση με τους υγιείς και αυτό φαίνεται να συνεισφέρει στην ήδη αυξημένη συγκέντρωση των κεραμιδίων [214].

Τα κεραμίδια, ως σηματοδοτικά μόρια έχει φανεί πως συνεισφέρουν στην παθογένεια της στεάτωσης και στεατοηπατίτιδας με πολλαπλούς μηχανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, τα κεραμίδια έχει περιγραφεί ότι μειώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη τόσο στους σκελετικούς μύες όσο και στα ηπατοκύτταρα [214]. Μάλιστα, σε μελέτες ζωικών μοντέλων η χορήγηση αναστολέων της βιοσύνθεσης των κεραμιδίων οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη [220]. Αν και η αύξηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή κεραμιδίων, είναι πιθανό τα κεραμίδια μέσω μηχανισμών ανατροφοδότησης να προκαλούν περαιτέρω αύξηση των κυτταροκινών και ενεργοποίηση φλεγμονωδών διεργασιών [214]. Επιπλέον, τα κεραμίδια έχει φανεί πως συμμετέχουν στο οξειδωτικό στρες, τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και την κυτταρική απόπτωση [214,221]. Τέλος, είναι πιθανό να επηρεάζουν ακόμα και την σύνθεση των HDL λιποπρωτεϊνών και συνεπώς την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Σε μελέτη που διενεργήθηκε σε αρουραίους western diet, η χορήγηση μυριοσίνης, ενός αναστολέα της βιοσύνθεσης των κεραμιδίων, όχι μόνο βελτίωσε τη στεάτωση και την αντίσταση στην ινσουλίνη, αλλά οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού παραγωγής των apoA1 και κατά συνέπεια το ρυθμού παραγωγής των HDL λιποπρωτεϊνών [222].

Ουδέτερα λιπίδια

Μέχρι και σήμερα οι μελέτες, που διερεύνησαν τις ποσοτικές διαφορές των ουδέτερων λιπιδίων σε ασθενείς με στεάτωση του ήπατος, είναι περιορισμένες. Τα τριγλυκερίδια όπως είναι αναμενόμενο, έχουν βρεθεί αυξημένα σε ηπατικές βιοψίες ασθενών με στεάτωση, ενώ αντίθετα δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων [174,179]. Οι διακυλογλυκερόλες (DG) επίσης έχει φανεί πως αυξάνονται στο ήπαρ και μάλιστα ο λόγος TG/DG αυξάνεται σταδιακά από την πρόοδο της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα [174]. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι πιθανά η DGAT συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της NAFLD [174]. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση αναστολέων της DGAT-2 σε αρουραίους μείωσε την ηπατική στεάτωση, βελτίωσε την ηπατική φλεγμονή και ίνωση [223]. Μάλιστα, σε μελέτη φάσης 1 η χορήγηση του αναστολέα DGAT-2 σε ασθενείς με NASH οδήγησε σε βελτίωση της στεάτωσης και των δεικτών ηπατικής λειτουργίας και επί του παρόντος βρίσκεται σε εξέλιξη μελέτη φάσης 2 με ervogastat (PF-06865571) με ενθαρρυντικά αρχικά ευρήματα [224,225].

Σε ό,τι αφορά τη χοληστερόλη, πλήθος μελετών κάνει λόγο για διαταραχή στην ομοιοστασία της στην περίπτωση της λιπώδους νόσου του ήπατος [226,227]. Η συσσώρευση στο ήπαρ της ελεύθερης χοληστερόλης φαίνεται να σχετίζεται με την πρόοδο της νόσου από

απλή στεάτωση σε στεατοηπατίτιδα, χωρίς να παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας σε εστέρες χοληστερόλης [174]. Ωστόσο, από άλλες μελέτες τα ευρήματα για την εστεροποιημένη χοληστερόλη είναι αντικρουόμενα [179]. Η ελεύθερη χοληστερόλη θεωρείται κυτταροτοξικό λιπίδιο και έχει ενοχοποιηθεί για συμμετοχή σε παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της ηπατοτοξικότητας [228]. Συγκεκριμένα, η ελεύθερη χοληστερόλη προκαλεί διαταραχή της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, αυξάνει το οξειδωτικό στρες με επακόλουθα την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την κυτταρική απόπτωση [228]. Συνεπώς, η αύξηση της ελεύθερης χοληστερόλης που έχει παρατηρηθεί στο λιπώδες ήπαρ συμμετέχει και αυτή στη λιποτοξικότητα και την ηπατική βλάβη.

Λιπαρά Οξέα

Η σύσταση των λιπαρών οξέων διαφέρει στους ασθενείς με απλή στεάτωση, σε σχέση με τους υγιείς αλλά και σε σύγκριση με τους ασθενείς με στεατοηπατίτιδα. Σε βιοψίες ασθενών με NAFLD αυξάνονται τα κορεσμένα λιπαρά οξέα [174]. Αναλυτικότερα, σε δείγματα ήπατος NASH ασθενών έχει παρατηρηθεί αύξηση σε συγκεκριμένα κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως το μυριστικό και το παλμιτικό οξύ [173]. Οι Walle et al. διενεργήσαν μία από τις πιο αναλυτικές μελέτες της σύστασης των λιπαρών οξέων στον ορό αυτών των ασθενών και παρατήρησαν αύξηση των συνολικών κορεσμένων λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων στους ασθενείς με NASH σε σχέση με τους ασθενείς με απλή στεάτωση [229]. Επιπλέον, τα επίπεδα του μυριστικού οξέος των εστέρων χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, καθώς και αυτά του στεατικού οξέος των τριγλυκεριδίων έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με NASH [229]. Ακόμη, αύξηση ολικών κορεσμένων λιπαρών οξέων παρατηρήθηκε στα φωσfolιπίδια του πλάσματος ασθενών με NAFLD [230]. Η αυξημένη *de novo* λιπογένεση που χαρακτηρίζει την NAFLD καθώς και η δίαιτα πλούσια σε αυτά τα λιπαρά οξέα είναι πιθανά οι κύριοι λόγοι αύξησής τους στον ορό και στο ήπαρ των ασθενών με λιπώδες ήπαρ [231]. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα διαθέτουν προ-αποπτωτικές ιδιότητες και συμμετέχουν στην παθογένεια της πάθησης. Η αύξησή τους στα ηπατοκύτταρα προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενεργοποίηση του μονοπατιού της κασπάσης και τελικά ηπατοκυτταρική απόπτωση [232].

Πίνακας 7. Κύριες lipidomics μελέτες στον ορό/πλάσμα ασθενών με NAFLD

Ref.	Βιολογικό δείγμα	Κύρια ευρήματα σε NAFLD ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς	Κύρια ευρήματα σε NASH ασθενείς σε σύγκριση με NAFL
Puri et al[176], 2009	Πλάσμα	Αύξηση: DAG, TAG, MUFA, dihomogamma-linolenic acid, παλμιτολεϊκό οξύ, ολεϊκό οξύ, παλμιτολεϊκό οξύ προς παλμιτικό σε NAFLD, σταδιακή αύξηση των μεταβολιτών λιποξυγενάσης (LOX) 5-HETE, 8-HETE, and 15-HETE από υγιείς σε NAFL και NASH; 11-HETE σε NASH σε σύγκριση με υγιείς Μείωση: LA; ολικά πλασμαλογόνα σε NASH σε σύγκριση με υγιείς.	
Zheng et al[230], 2012	Προφίλ λιπαρών οξέων PL πλάσματος	Αύξηση: Dihomogamma-linolenic acid (C20: 3n-6), ολικά SFA σε PL Μείωση: Eicosanoic acid (C20: 0), cis-11-octadecenoic acid (C18: 1n-7), DHA σε PL.	
Loomba et al[233], 2015	Προφίλ εικοσανοειδών πλάσμα	Αύξηση: 15-HETE, 5,6-diHETrE. Μείωση: 12,13-diHOME.	Αύξηση: 11,12-diHETrE, dhk PGD2, και 20-COOH AA.
Walle et al[229], 2016	Ορός	Αύξηση: Palmitoleic acid των CE σε ασθενείς με NAFLD. Μείωση: LA και ολικά n-6 λιπαρά οξέα στα TAG των ασθενών με NASH.	Αύξηση: SFA των TAG σε ασθενείς με NASH, μυριστικό οξύ σε CE και TAG, στεαρικό οξύ σε TAG.
Tiwari-Heckler et al[177], 2018	Ορός	Αύξηση: PC και SM σε NAFL και NASH. Μείωση: Lysophosphatidylethanolamine σε NAFL και NASH ασθενείς.	Αύξηση: PE σε ασθενείς με NASH.
Ma et al [27], 2016	Πλάσμα	Αύξηση: PS και PI σε NAFL και NASH, DHA και AA σε PS των NAFL και NASH.	

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease; NAFL: nonalcoholic fatty liver; NASH: Nonalcoholic steatohepatitis; DAG: Diacylglycerol; TAG: Triacylglycerol; SFA: Saturated Fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PC: Phosphatidylcholine; HETE: Hydroxyeicosatetraenoic acid; 5,6-diHETrE : 5,6 dihydroxy- eicosatrienoic acid; 12,13-diHOME: 12,13-dihydroxy-9- octadecenoic acid; CE: Cholesteryl ester; PE: Phosphatidylethanolamine; LA: Linoleic acid (C18:2n-6); DHA: 11,12-diHETrE: 11,12-dihydroxy- eicosatrienoic acid; dhk PGD2: 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin D2; 20-COOH AA: 20-carboxy arachidonic acid; SM: Sphingomyelin; PE: Phosphatidylethanolamine; PS: Phosphatidylserine; PI: Phosphatidylinositol.

Στο πλάσμα και στο ήπαρ ασθενών με NAFLD όμως έχει παρατηρηθεί και αύξηση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων [171,172,179,204]. Σε ορισμένες μελέτες, η αύξηση αυτή αφορούσε κυρίως το παλμιτολεϊκό οξύ και ολεϊκό οξύ [172,176]. Τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα παράγονται από κορεσμένα λιπαρά οξέα με τη δράση του ενζύμου stearyl-CoA δεσатуράση (SCD1). Η αύξηση των μονοακόρεστων θα μπορούσε να αποδοθεί τόσο στην

αυξημένη *de novo* λιπογένεση τόσο όμως και στην αυξημένη δραστικότητα της SCD1 [234]. Πράγματι, η έκφραση του γονιδίου της SCD1 έχει βρεθεί πως αυξάνεται σημαντικά στους ασθενείς με στεατοηπατίτιδα και ακολουθεί την αύξηση του ολεϊκού και παλμιτολεϊκού οξέος [173]. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα θεωρείται πως συνεισφέρουν στην ανάπτυξη στεάτωσης, αλλά ενσωματώνονται ευκολότερα στα ηπατικά τριγλυκερίδια και συνεπώς είναι λιγότερα λιποτοξικά από τα κορεσμένα. Ακόμη, έχει προταθεί πως διαθέτουν προστατευτικό ρόλο έναντι της λιποτοξικότητας προάγοντας τη συσσώρευση των τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα [235].

Το πιο κοινό εύρημα στις μελέτες λιπιδικής σύστασης είναι η μείωση των μακράς αλύσου πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί μείωση εικοσαπεντανοϊκού οξέος, αραχιδονικού και εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος [171,172,174,175]. Τα χαμηλά επίπεδα αυτών των ω-3 και ω-6 PUFA μπορούν να αποδοθούν είτε σε χαμηλή διαιτητική πρόσληψη είτε σε διαταραχή της βιοσύνθεσής τους. Η σύνθεσή τους αποτελεί μία πολύπλοκη διεργασία πολλαπλών σταδίων, στην οποία συμμετέχουν διάφορα ένζυμα επιμήκυνσης και αποκορεσμού των λιπαρών οξέων. Σε ασθενείς με NASH, η δραστικότητα της δεσатуράσης των λιπαρών οξέων 1 (FADS1) αλλά και της ELOVL6 είναι μειωμένες [173]. Επιπλέον, η μειωμένη δραστικότητα της FADS1 θεωρείται ένας σημαντικός παθογενετικός παράγοντας στην πρόοδο της νόσου από απλή στεάτωση σε στεατοηπατίτιδα. Ένα ακόμα ενδιαφέρον εύρημα σε αυτές τις μελέτες ήταν η αύξηση του λόγου ω-6/ ω-3 που παρατηρήθηκε σε βιοψίες ασθενών με NASH [171,174]. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, και συγκεκριμένα τα ω-3 συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες και μάλιστα πιστεύεται πως διαθέτουν προστατευτικό ρόλο έναντι της λιποτοξικότητας και της αντίστασης στην ινσουλίνη [236]. Η αποκατάσταση της περιεκτικότητας του ήπατος σε ω-3 έχει φανεί πως βελτιώνει τη στεάτωση και την στεατοηπατίτιδα και μειώνει την νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα σε ζωικά μοντέλα στεατοηπατίτιδας [236]. Επιπλέον, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αλληλοεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στην ανάπτυξη της ίνωσης [237,238].

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα επιπλέον αποτελούν πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση των προφλεγμονωδών εικοσανοειδών και των specialized pro-resolving mediators. (SPMs). Τα SPMs είναι λιπιδικοί μεσολαβητές που παίζουν σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον της φλεγμονής, αποτρέποντας την υπερβολική αντίδραση του οργανισμού και προάγοντας την επίλυση της φλεγμονής [239]. Η βιοσύνθεση αυτών των λιπιδίων περιλαμβάνει διάφορα ένζυμα όπως κυκλοξυγενάσες και λιποξυγενάσες. Στο πλάσμα ασθενών παρατηρήθηκε μία σταδιακή αύξηση των μεταβολιτών της λιποξυγενάσης του αραχιδονικού οξέος από την ομάδα ελέγχου, την απλή στεάτωση και την στεατοηπατίτιδα [176]. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα προϊόντα της κυκλοξυγενάσης του αραχιδονικού οξέος ανάμεσα στις

ομάδες της μελέτης. Πιο αναλυτικά, οι μεταβολίτες της λιποξυγενάσης 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, και 15-HETE έχουν βρεθεί αυξημένοι στους ασθενείς με NASH [176]. Αργότερα, οι Loomba et al, μελέτησαν το λιπιδικό προφίλ των εικοσανοειδών στο πλάσμα ασθενών με λιπώδες ήπαρ και ανέφεραν σημαντικά αύξηση των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος 11,12-diHETrE, dhk PGD2, and 20-COOH AA, στην περίπτωση της στεατοηπατίτιδας σε σύγκριση με την απλή στεάτωση [233].

Περιορισμοί μελετών του λιπιδικού προφίλ στο πλάσμα

Από το σύνολο των μελετών που διεξήχθησαν στον ορό ή στο πλάσμα των ασθενών παρατηρείται σημαντική ανομοιογένεια στα ευρήματά τους, ενώ αντικρουόμενα αποτελέσματα παρατηρούνται και από τη σύγκριση των μελετών που διενεργήθηκαν στο ήπαρ με αυτές στον ορό. Οι πιο αξιοσημείωτες διαφορές που παρατηρούνται αφορούν κυρίως τη σύσταση των γλυκεροφωσfolιπιδίων παρά τη σύσταση των λιπαρών οξέων. Γενικά, οι μελέτες λιπιδικής σύστασης του ήπατος έδειξαν μείωση διαφόρων ειδών γλυκεροφωσfolιπιδίων, όπως η PC, η PE, η PS και η PI σε ασθενείς με NAFLD, και σε ορισμένες περιπτώσεις αυτές οι αλλαγές αναγνωρίζονταν μόνο στην περίπτωση της NASH. Αντιθέτως, οι περισσότερες μελέτες του πλάσματος απέτυχαν να ανιχνεύσουν ελάττωση αυτών των λιπιδίων και σε ορισμένες περιπτώσεις τα γλυκεροφωσfolιπίδια του πλάσματος βρέθηκαν να είναι αυξημένα σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα γλυκεροφωσfolιπίδια του πλάσματος μεταφέρονται και διανέμονται στις λιποπρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η PC και η PE του πλάσματος εντοπίζονται κυρίως στη λιποπρωτεΐνη HDL και το 50% της ηπατικής PC προέρχεται από την κυκλοφορία, πιθανώς μέσω της αντίστροφης μεταφοράς HDL-PC στο ήπαρ [240,241]. Έτσι, η χαμηλή περιεκτικότητα του ηπατικού παρεγχύματος σε γλυκεροφωσfolιπίδια, σε μια προσπάθεια διατήρησης των επιπέδων τους μπορεί να οδηγεί στην ενεργοποίηση άγνωστων αντισταθμιστικών διεργασιών, με στόχο την αυξημένη επιστροφή φωσfolιπιδίων της HDL και τη συνεπακόλουθη αύξηση των επιπέδων στο πλάσμα.

Επιπλέον, ανομοιογένεια παρατηρείται και στα αποτελέσματα μελετών που αφορούν την περιεκτικότητα της SM στο ήπαρ και στο πλάσμα. Περίπου το 50% του πλάσματος SM βρίσκεται στην LDL και το 40% στην HDL, και αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα του πλάσματος SM συσχετίζονται με τον ΔΜΣ [205,240]. Οι διαφορές στο σχεδιασμό των μελετών, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής παχύσαρκης πληθυσμιακής ομάδας ως ομάδας ελέγχου, μπορούν να εξηγήσουν τα διαφορετικά αποτελέσματα των μελετών. Ακόμη, αλλαγές στην περιεκτικότητα της SM στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, λόγω διαιτητικών παραγόντων

παχυσαρκίας ή και άγνωστων αντισταθμιστικών μηχανισμών, μπορεί να ευθύνονται για τις διαφορές των σφιγγολιπιδίων, που παρατηρούνται στις μελέτες του ήπατος και του πλάσματος.

Περαιτέρω μελέτες λιπιδικής ανάλυσης που επικεντρώνονται στην περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων στις λιποπρωτεΐνες σε ασθενείς με NAFLD είναι απαραίτητες, για να ανιχνευθούν οι μεταβολές που συμβαίνουν στο πλαίσιο της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος.

Ο Ρόλος των Lipidomics στην ανάδειξη βιοδεικτών της NASH

Προς το παρόν, η διάγνωση της νόσου και η διάκριση της NASH από την απλή στεάτωση απαιτούν βιοψία του ήπατος και ιστολογική εξέταση του ηπατικού παρεγχύματος. Ωστόσο, η βιοψία του ήπατος είναι μια επεμβατική, δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία. Συνεπώς, τα τελευταία χρόνια με την αυξανόμενη επίπτωση της νόσου, γίνεται όλο και πιο επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης μη επεμβατικών μεθόδων για τη διάγνωση της NASH και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της φαρμακευτικής αγωγής. Αναλύσεις του λιπιδικού προφίλ σε βιοψίες ήπατος ασθενών με NAFL και σε ασθενείς με NASH ανίχνευσαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση των λιπιδίων στο ήπαρ και ακολούθως αρκετές μελέτες διερεύνησαν εάν αυτές οι αλλαγές αναγνωρίζονται στο πλάσμα ή τον ορό των ασθενών. Ωστόσο, όπως έχει υπογραμμιστεί παραπάνω, τα αποτελέσματα των μελετών είναι ανομοιογενή. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, κορεσμένα λιπαρά οξέα στα τριγλυκερίδια, όπως το μυριστικό και το στεατικό οξύ, βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με αυτούς με NAFL [229]. Επιπλέον, μελέτες στο προφίλ εικοσανοειδών στο πλάσμα αποκάλυψαν σημαντική αύξηση των μεταβολιτών που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ (11,12-diHETrE, dhk PGD2 και 20- COOH AA) σε ασθενείς με NASH, σε σύγκριση με άτομα με απλή στεάτωση και συνεπώς αυτά τα εικοσανοειδή μπορεί να έχουν χρησιμότητα ως βιοδείκτες για τη μη επεμβατική διάγνωση της NASH [233]. Μεταβολίτες λιποξυγενάσης και συγκεκριμένα 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE και 15-HETE επίσης βρέθηκαν αυξημένοι στο πλάσμα ασθενών με NASH και έχουν αναγνωριστεί ως υποσχόμενοι προγνωστικοί βιοδείκτες της NASH [176].

Οι Gorden et al. διερεύνησαν τις αλλαγές στη σύσταση των λιπιδίων που παρατηρούνται στο ήπαρ και ταυτόχρονα στο πλάσμα ασθενών με NAFLD [178]. Ο πληθυσμός της μελέτης κατηγοριοποιήθηκε ανάλογα με το στάδιο της νόσου και η μελέτη περιλάμβανε τους υγιείς, ασθενείς με απλή στεάτωση, ασθενείς με NASH και άτομα με κίρρωση. Οι αναλύσεις στο λιπιδικό προφίλ τόσο του ήπατος όσο και το πλάσματος σε συνδυασμό με αναλύσεις άλλων μεταβολιτών οδήγησαν στον εντοπισμό 48 κοινών αναλυτών, οι οποίοι παρουσίαζαν μεταβολή

κατά την πρόοδο της νόσου και επικάλυψη και στους δύο ιστούς. Αυτοί οι μεταβολίτες ήταν είδη σφιγγολιπιδίων, όπως διυδροκεραμίδια, 1-δεοξυδιυδροκεραμίδια και μακράς αλύσου κεραμίδια. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο μεταβολισμός των σφιγγολιπιδίων διαταράσσεται στην περίπτωση της στεάτωσης. Ακόμη, οι Gorden et al. εντόπισαν ένα πάνελ από 20 λιπίδια στο πλάσμα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για να διακρίνουν τη NASH από την απλή στεάτωση. Αυτή η ομάδα λιπιδίων περιλάμβανε διυδροσφιγγολιπίδια, αιθεροφωσφατιδυλοχολίνες και άλλα είδη. Ωστόσο, ο αριθμός των ασθενών που συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη είναι σχετικά μικρός και απαιτείται η επικύρωση αυτών των ευρημάτων σε μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών [178]. Αργότερα, ο Zhou και η ομάδα του ανέπτυξαν ένα μοντέλο βασισμένο στην φασματοσκοπία μάζας και ένα διαγνωστικό σύστημα βαθμολόγησης για τη NASH, με AUROC 0,86. [139]. Το σκορ ClinLipMet για τη NASH περιλάμβανε την AST, γλυκόζη νηστείας, γλουταμίνη, ισολευκίνη, γλυκίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη 16:0, και φωσφοαιθολοναμίνη 40:6 μαζί με το γονότυπο PNPLA3. Ωστόσο, επί του παρόντος δεν έχει γίνει εξωτερική επικύρωση του συγκεκριμένου σκορ.

4. Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μια φασματοσκοπική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στο πεδίο των Metabonomics και βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες του πυρήνα του ατόμου (π.χ. ^1H , ^{13}C ή ^{31}P). Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται όταν οι πυρήνες συγκεκριμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και στη συνέχεια διεγείρονται από ένα δεύτερο, ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Η συμπεριφορά ενός πυρήνα κατά το NMR σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο αποκαλύπτει σημαντικές πληροφορίες για τη δομή και τις χημικές ιδιότητες ενός μορίου. Λόγω της υψηλής παρουσίας των πυρήνων πρωτονίου (^1H) στα βιομόρια, η φασματοσκοπία πρωτονίου (^1H -NMR) χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση βιολογικών υγρών, όπως το πλάσμα αίματος, τα ούρα και τα εκχυλίσματα ιστών. Κάθε διακριτό σήμα σε ένα φάσμα ^1H -NMR αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη χημική ένωση [242,243]

Οι σύγχρονες εξελίξεις στη φασματοσκοπία NMR, όπως η ανάπτυξη δισδιάστατων (2D) και πολυδιάστατων (multidimensional) τεχνικών, έχουν συμβάλει σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση της σύστασης των βιολογικών υγρών και της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών [242]. Η μονοδιάστατη (1D) φασματοσκοπία ^1H -NMR είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ, ενώ η εφαρμογή της δισδιάστατης (2D) NMR είναι λιγότερο συχνή και περιορίζεται σε πιο συγκεκριμένες περιπτώσεις.

Θεωρία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Οι πυρήνες όλων των στοιχείων είναι θετικά φορτισμένα σωματίδια και, λόγω της ιδιοπεριστροφής τους (spin), συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα, δημιουργώντας μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής τους. Σε περιβάλλον χωρίς μαγνητικό πεδίο, οι πυρήνες αυτοί έχουν τυχαίο προσανατολισμό στο χώρο. Ωστόσο, όταν τοποθετηθούν μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο, αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Για πυρήνες με κβαντικό αριθμό spin $I=1/2$, όπως του υδρογόνου (H) και του άνθρακα (C), υπάρχουν δύο δυνατοί προσανατολισμοί: παράλληλος προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (μικρότερη ενέργεια) και αντιπαράλληλος (μεγαλύτερη ενέργεια). Όταν αυτοί οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συγκεκριμένης συχνότητας, οι πυρήνες που βρίσκονται σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας απορροφούν ενέργεια και

μεταβαίνουν σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή του spin τους. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) [244–246]

Η συχνότητα που απαιτείται για να συντονιστεί ένας πυρήνας εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από τον τύπο του πυρήνα. Οι πυρήνες χωρίζονται σε δύο βασικές ομάδες: αυτούς με άρτιους ατομικούς και μαζικούς αριθμούς, που δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και δεν δίνουν φάσματα NMR, και αυτούς με περιττούς μαζικούς αριθμούς (π.χ. ^1H), που έχουν μαγνητικές ιδιότητες και παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη φασματοσκοπία NMR. Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών γίνεται μέσω της χημικής μετατόπισης, της σύζευξης spin-spin και της αποδιέγερσης των πυρήνων, που σχετίζονται με τη θερμοδυναμική κατάσταση των spin τους.

α) Χημική μετατόπιση (δ scale σε ppm): Η χημική μετατόπιση αναφέρεται στην αλλαγή της συχνότητας συντονισμού των μαγνητικών πυρήνων, η οποία επηρεάζεται από το χημικό περιβάλλον τους. Αυτό το φαινόμενο χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των χημικών ενώσεων.

β) Σύζευξη spin-spin: Η σύζευξη spin-spin είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μια κορυφή συντονισμού διασπάται σε πολλαπλές συμμετρικές κορυφές λόγω της αλληλεπίδρασης των spin γειτονικών πυρήνων. Αυτή η διαδικασία παρέχει πληροφορίες για τη στερεοχημεία και τη δομή των μορίων.

γ) Αποδιέγερση ή Επαναφορά: Αυτή η διαδικασία αφορά την επιστροφή των πυρήνων στην αρχική θερμοδυναμική τους κατάσταση στο μαγνητικό πεδίο [244–246]

Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός στηρίζεται στη λήψη φασμάτων NMR από δείγματα που τοποθετούνται μέσα σε ισχυρά μαγνητικά πεδία. Η ακρίβεια των φασμάτων εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου, με πιο ισχυρά πεδία να προσφέρουν πιο λεπτομερή και καθαρά αποτελέσματα.

Ο φασματογράφος NMR αποτελείται από έναν υπεραγωγίμο μαγνήτη που ψύχεται με υγρό ήλιο και περιβάλλεται από μόνωση υγρού αζώτου. Ο μαγνήτης αυτός διατηρεί σταθερό το μαγνητικό πεδίο και παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για τη μελέτη των πυρήνων των δειγμάτων. Στο κέντρο του μαγνητικού συστήματος βρίσκεται ο αισθητήρας (probe), ο οποίος περιλαμβάνει κυκλώματα για την εκπομπή και λήψη υψίσυχων παλμών. Αυτοί οι παλμοί διεγείρουν τους πυρήνες των ατόμων στο δείγμα, προκαλώντας τους να εκπέμψουν σήματα καθώς επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση.

Η διαδικασία αυτή καταγράφεται και μετατρέπεται σε φάσμα μέσω ενός μετασχηματισμού Fourier. Το φάσμα αυτό περιέχει όλες τις πληροφορίες για τη χημική σύνθεση του δείγματος και επιτρέπει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των διαφόρων συστατικών [247]

Στοχευμένη (targeted) όσο και για τη μη στοχευμένη (untargeted) προσέγγιση

Η μεταβολομική ανάλυση με τη χρήση της τεχνικής $^1\text{H-NMR}$ διακρίνεται σε δύο προσεγγίσεις: τη στοχευμένη (Targeted Metabolite Profiling) και τη μη στοχευμένη (Untargeted Metabolite Profiling). Στη στοχευμένη ανάλυση, η έμφαση δίνεται στην ποσοτική μέτρηση συγκεκριμένων μεταβολιτών, καθιστώντας την κατάλληλη για τον έλεγχο υποθέσεων και την ανίχνευση βιοδεικτών, κυρίως σε κλινικές εφαρμογές. Αντίθετα, η μη στοχευμένη ανάλυση εξετάζει το πλήρες φάσμα των μεταβολιτών, παρέχοντας μια συνολική εικόνα του μεταβολικού προφίλ. Η τελευταία υιοθετεί μια αντικειμενική προσέγγιση και εντοπίζει όλους τους μεταβολίτες εντός ενός καθορισμένου εύρους παραμέτρων, εστιάζοντας στις σχετικές διαφορές στην αφθονία των μεταβολιτών και όχι στις απόλυτες συγκεντρώσεις τους [248]

Επεξεργασία Φασμάτων $^1\text{H-NMR}$

Η σωστή διαχείριση των δεδομένων είναι απαραίτητη για την επεξεργασία των φασμάτων και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που λαμβάνονται μέσω της τεχνικής $^1\text{H-NMR}$, πρέπει αρχικά να υποβληθούν σε προεπεξεργασία, η οποία περιλαμβάνει τη διόρθωση της φάσης και της βασικής γραμμής του φάσματος, καθώς και τη βαθμονόμησή του. Σε περιπτώσεις μη στοχευμένης ανάλυσης, ενδέχεται να απαιτείται η αποκοπή συγκεκριμένων περιοχών του φάσματος. Τέλος, πραγματοποιείται βελτίωση του ληφθέντος φάσματος, ενώ η ολοκλήρωση των κορυφών προσφέρει πληροφορίες για τον αριθμό των πρωτονίων της εξεταζόμενης ουσίας [246]

Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τη στοχευμένη ανάλυση πρέπει να υποβληθούν σε στατιστική επεξεργασία για την αναγνώριση στατιστικά σημαντικών βιοδεικτών και για τη διάκριση ομοιοτήτων ή διαφορών μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων.

Πολυπαραγοντική ανάλυση (Multivariate data analysis, MDA)

Η πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων (MDA) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στη μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση για την επεξεργασία δεδομένων από διάφορες αναλυτικές διαδικασίες. Οι πιο κοινές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και την διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA). Η PCA είναι μια μη εποπτευόμενη τεχνική που μειώνει τις αρχικές μεταβλητές σε νέες, κύριες συνιστώσες, επιτρέποντας την καλύτερη εξήγηση των δεδομένων και τη γενική εικόνα των μεταβολικών προφίλ. Στη μεταβολομική, η PCA χρησιμοποιείται κυρίως ως πρώτη μέθοδος για να αποκτηθεί μια συνολική εικόνα των μεταβολικών προφίλ που μελετώνται, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τις τάσεις (trends) που παρουσιάζουν, ενώ η ανίχνευση ακραίων τιμών (outliers) αποτελεί δευτερεύοντα στόχο. Η PLS-DA, ως εποπτευόμενη μέθοδος, συνδυάζεται συχνά με την PCA για την ενίσχυση του διαχωρισμού μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων, όπως οι υγιείς και οι ασθενείς, και την παροχή πληροφοριών για τις μεταβολικές διαφορές τους. Αυτές οι τεχνικές βοηθούν στη διάκριση των ομάδων και στον εντοπισμό των μεταβολιτών που συμβάλλουν στις διαφορές αυτές, προσφέροντας μια συνολική εικόνα του μεταβολικού προφίλ χωρίς να επικεντρώνονται στην ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μεταβολιτών.[249]

5. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση συνολικού μεταβολικού προφίλ και του λιπιδικού προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με NAFLD, με στόχο την αναγνώριση των μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την πάθηση και την εξήγηση του αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου που παρουσιάζουν οι εν λόγω ασθενείς.

6. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή δειγμάτων

Ο υπό μελέτη πληθυσμός περιλαμβάνει 62 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.

- **Μεταβολικό προφίλ του ορού**

Ασθενείς με NAFLD : 62

Ομάδα ελέγχου (υγιείς εθελοντές) : 43

- **Λιπιδικής σύστασης της HDL λιποπρωτεΐνης**

Ασθενείς με NAFLD: 51

ομάδα ελέγχου 1 (υγιείς εθελοντές) : 50

ομάδα ελέγχου 2 (ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο) : 40

Συνολικά το μεταβολικό προφίλ του ορού μελετήθηκε στους 65 ασθενείς, ενώ μελέτη της λιπιδικής σύστασης της HDL λιποπρωτεΐνης διενεργήθηκε σε 51 από αυτούς του ασθενείς.

Ως ομάδα ελέγχου επιλέχθηκαν υγιή άτομα με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό. Συγκεκριμένα, 43 υγιείς εθελοντές ως ομάδα ελέγχου για την μελέτη του μεταβολικού προφίλ του ορού και 50 υγιείς για την μελέτη της λιπιδικής σύστασης των HDL σωματιδίων. Η ομάδα των ασθενών

με καρδιαγγειακή νόσο (CHD) αποτελείται από 40 ασθενείς με επιβεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο.

Σε όλες τις ομάδες διεξήχθη βιοχημικός και αιματολογικός έλεγχος. Τα επίπεδα γλυκόζης, λιπιδίων και οι υπόλοιπες εξετάσεις του βιοχημικού ελέγχου στον ορό προσδιορίστηκαν στο Βιοχημικό Εργαστήριο (Κλινικής Χημείας) του Π.Γ.Ν.Ι.

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 φυγοκέντρωση, έγινε συλλογή του ορού, ο οποίος μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια τύπου Cryovials και καταψύχθηκε σε θερμοκρασία -80°C .

Εργαστηριακός εξοπλισμός και απαιτούμενα αντιδραστήρια

Για την εκτέλεση των πειραμάτων απαιτήθηκαν τα παρακάτω όργανα-σκεύη

1. Φασματογράφος Bruker Avance DRX και 500MHz
2. Ζυγός (AdventurerTM, OHAUS)
3. Φίλτρα χωρητικότητας 2mL (Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 2 mL, για διήθηση συστατικών έως 3kDa)
4. Φυαλίδια κωνικού σχήματος Eppendorf 1,5 mL
5. Πιπέτες: 200-1000 μL , 10-100 μL (Transferpette®S Pipette, adjustable volume Single Channel, BrandTech Scientific INC, Germany)
6. Σωληνάρια NMR (NMR tubes εσωτερικής διαμέτρου 5mm)
7. Πλαστικά σωληνάρια Cryovials (Cryo TubeTM Vials, NUNC)

Για τη διενέργεια των πειραμάτων απαιτήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια

1. Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, MB= 121.14g/mol, Sigma-Aldrich)
2. Χλωριούχο Νάτριο (NaCl , MB=58.44g/mol, Merck)
3. Θειική δεξτράνη (Dextran-Sulfate, Dextralip®, MB=50.000g/mol, 5gr, Sigma-Aldrich)
4. Ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 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)

9. Απεσταγμένο ύδωρ
10. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.2 M Na₂HPO₄/ 0.2 M pH 7.4, Na₂HPO₄, MB=141.96 g/mol, Riedel-de Haen, NaH₂PO₄*2H₂O, MB=156.02 g/mol, Merck)
11. Διάλυμα D₂O/TSP (Δευτεριωμένο Ύδωρ, D₂O, MB=20.03 g/mol, Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%, περιεκτικότητας 0.75 w.t % σε δευτεριωμένο άλας νατρίου 3- (trimethylsilyl)- propionic-2,2,3,3-d₄ (TSP, MB =172.27 g/mol, Sigma-Aldrich))

6.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων

Τα βιολογικά δείγματα τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80 °C, παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) για περίπου 30 λεπτά για την απόκτηση θερμικής ισορροπίας και ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή Vortex (VELP Scientifica, Usmate Velate, Italy) για ομογενοποίηση των δειγμάτων.

6.2.1. Μεταβολικό προφίλ του ορού

Καθώς τα δείγματα ορού είναι πλούσια σε μακρομόρια (πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες) τα οποία παρεμποδίζουν τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους στη φασματοσκοπία NMR, πριν τη λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό φυγοκέντρηση (υπερδιήθηση) του ορού/πλάσματος.

Διήθηση υπό φυγοκέντρηση (υπερδιήθηση) ορού του αίματος

Για την απομάκρυνση των μακρομορίων, χρησιμοποιήθηκαν τα φίλτρα Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (εικ. 9). Με τα συγκεκριμένα φίλτρα επιτυγχάνεται ταχεία υπερδιήθηση διαλυμάτων, καθώς επιτρέπουν τη διήθηση συστατικών μεγέθους έως 3kDa. Με βάση το μοριακό βάρος των μεταβολιτών ο χρόνος

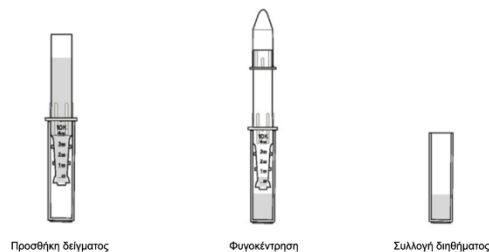
φυγοκέντρωσης του δείγματος καθορίστηκε στα 60 min. Η φυγοκέντρωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε φυγόκεντρο υψηλής ταχύτητας με ελεγχόμενη θερμοκρασία θαλάμου (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) και με κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων (swinging bucket rotor).



Εικόνα 10 Φίλτρα Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (for volumes up to 2 mL)

Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλάμβανε τα παρακάτω βήματα :

1. Έκπλυση των φίλτρων (3x500μL απεσταγμένο ύδωρ 40°C) για να απομακρυνθούν τα ίχνη γλυκερόλης που χρησιμοποιείται ως συντηρητικό των φίλτρων.
2. Φυγοκέντρωση μετά την εκάστοτε έκπλυση στα 4000g για 30min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
3. Προσθήκη 800μL ορού/ αίματος σε κάθε φίλτρο.
4. Φυγοκέντρωση στα 4000g για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
5. Συλλογή της ποσότητας του διηθήματος, περίπου 400μL, σε σωληνάκια Cryovials (CryoPure 1.0 mL, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany).
6. Αποθήκευση στους -80 °C.



Εικόνα 11 Βήματα διαδικασίας φιλτραρίσματος δείγματος ορού

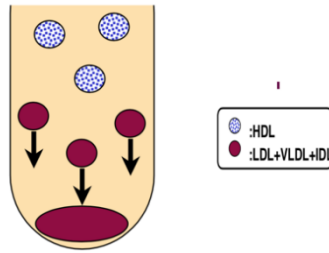
Προεργασία των διηθημάτων του ορού για τη λήψη των φασμάτων ¹HNMR

Σε 400μL διηθήματος ορού προστίθενται 200μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών για την ρύθμιση του pH στην περιοχή 7.4 ± 0.5 και ελαχιστοποίηση των μεταβολών του. Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο μίγμα των 600μL και αναμονή 10min για πλήρη ανάμειξη των δειγμάτων με το ρυθμιστικό διάλυμα. και 50μL διαλύματος D₂O/TSP μεταφέρθηκαν σε γυάλινο σωληνάριο NMR διαμέτρου 5mm. Το D₂O προστέθηκε ως διαλύτης για το κλείδωμα (lock) της συχνότητας πεδίου (field frequency lock solvent) του φασματογράφου NMR ενώ το TSP με τελική συγκέντρωση 0.456 mM αποτέλεσε την εσωτερική ουσία αναφοράς ($\delta^1\text{H}$ 0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων.

6.2.2. Λιπιδικό προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών

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 B, η οποία όμως ανευρίσκεται στο μόρια των IDL, LDL και VLDL λιποπρωτεϊνών. Η απολιποπρωτεΐνη B 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. 11) (86).



Εικόνα 12 Σχηματική παράσταση των μεθόδων καταβύθισης

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

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 μ l αντιδραστηρίου για κάθε 1ml δείγματος. Συνεπώς, στο γυάλινο φυαλίδιο που περιείχε 1,5ml δείγματος προστέθηκε 150 μ l 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 φυγοκέντρωση και περιέχει τις HDL λιποπρωτεΐνες συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε γυάλινα φυαλίδια.
6. Στην περίπτωση ατελούς καταβύθισης των non- HDL λιποπρωτεϊνών λόγω υψηλής τιμής τριγλυκεριδίων στον ορό, το υπερκείμενο που προέκυπτε από τη φυγοκέντρωση ήταν θολερό. Στις περιπτώσεις αυτές, έγινε επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας αφού πρώτα προστέθηκε 1ml από το διάλυμα NaCl (0,15M) και 100ml αντιδραστηρίου.

Εκχύλιση λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών

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 φυαλίδιο. 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.

Προεργασία των εκχυλισμάτων των λιπιδίων της HDL για τη λήψη των φασμάτων 1H NMR.

Μετά από παραμονή των κατεψυγμένων δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση τους σε μείγμα δευτεριωμένων διαλυτών. Το ανωτέρω μίγμα περιελάμβανε δευτεριωμένη μεθανόλη (Methyl-d₃ alcohol-d, με βαθμό δευτερίωσης 99.8%) και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Chloroform-d₁, 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).

6.2.3. Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων ^1H NMR

Η λήψη των φασμάτων ^1H -NMR έγινε στους 300K, στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX, εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11,74 Tesla, στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

A. Μεταβολικό προφίλ του ορού

Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD-90°-t1-90°-tm-90°-FID λήψη). Για κάθε φάσμα έγινε συλλογή 256 σαρώσεων (scans), 64K δεδομένων (data points) με εύρος φάσματος 6009.6 Hz το οποίο αντιστοιχεί σε 12.02 ppm. Ακολούθησε επεξεργασία των φασμάτων με το πρόγραμμα Bruker Topspin 3.5pl6 (Bruker-Franzen Analytik GmbH). Οι ελευθέρως φθίνουσες επαγωγές FIDs πολλαπλασιάστηκαν με εκθετική συνάρτηση (LB=0.3) (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) πλάτους 0.3 Hz. Μετά το μετασχηματισμό Fourier σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας, έγινε βαθμονόμηση (Calibration) με βάση το σήμα συντονισμού του TSP στα 0.000 ppm. Ακολούθησε διόρθωση φάσης (Phase Correction), μηδενικής και πρώτης τάξης για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών του φάσματος. Η διόρθωση της γραμμής βάσης (Baseline Correction) έγινε με τη χρήση μιας πολωνυμικής συνάρτησης 5ου βαθμού (Automatic Using Polynomial of Degree ABSG).

B. Εκχύλισμα των λιπιδίων της HDL

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.

6.2.4 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των λιπιδίων

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 ($C_{18}H_3$, $\delta=0,68\text{ppm}$) 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.

6.2.5 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών μεταβολικού προφίλ του ορού

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chenomx NMR Suite v.8.4 (Edmonton, AB, Canada), το οποίο περιλαμβάνει μια βιβλιοθήκη με πρότυπα φάσματα μεταβολιτών στα 500 MHz. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Human Metabolome Database (HMDB; <http://www.hmdb.ca>) και Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB, <http://www.bmrwisc.edu>), καθώς και η σχετική βιβλιογραφία για μεταβολομικές αναλύσεις βιολογικών υγρών μέσω φασματοσκοπίας NMR. Το TSP, σε γνωστή συγκέντρωση (0.456 mM), χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών στον ορό, με τις συγκεντρώσεις να εκφράζονται σε μM ($\mu\text{mol/L}$).

6.3 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

α) Μονομεταβλητή ανάλυση (univariate analysis): Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS (έκδοση 23.0; IBM Corp., Armonk, NY). Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Students' t-test για τη σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων και Anova test για σύγκριση τριών ομάδων. Το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε στο $p<0.05$, και τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως Μέση Τιμή $\pm$ Τυπική Απόκλιση (Mean $\pm$ SD).

β) Πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis): Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω του online λογισμικού MetaboAnalyst (v.4.0). Αρχικά, εφαρμόστηκε η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA) για μια γενική επισκόπηση των

δεδομένων, την ανίχνευση δειγμάτων με ακραία συμπεριφορά (outliers) και τον εντοπισμό τυχόν τάσεων ομαδοποίησης ή διαχωρισμού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis ή διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων) για να ενισχυθεί ο διαχωρισμός μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων με βάση το μεταβολικό προφίλ του ορού.

Η αξιολόγηση των στατιστικών μοντέλων που προέκυψαν από την ανάλυση PLS-DA βασίστηκε στις παραμέτρους R^2 , που εκτιμά την εξηγούμενη παραλλαγή και τον βαθμό προσαρμογής του μοντέλου στα δεδομένα, και Q^2 , που εκτιμά την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου (με $Q^2 > 0.5$ να θεωρείται «καλή» και $Q^2 > 0.9$ «άριστη»). Επιπλέον, για την επικύρωση των μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν δοκιμές μετάθεσης (permutation tests), όπου τα δεδομένα αναδιατάσσονται τυχαία επανειλημμένα και το μοντέλο επανυπολογίζεται. Τέλος, η καταγραφή των μεταβολιτών που συνέβαλαν σημαντικά στον διαχωρισμό των ομάδων πραγματοποιήθηκε με το γράφημα VIP (Variable Important Projection), όπου μεταβολίτες με τιμή $VIP > 1$ θεωρούνται ότι έχουν στατιστικά σημαντική συμβολή στον διαχωρισμό των ομάδων.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Ανάλυση μεταβολικού προφίλ του ορού του αίματος

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ομάδων που διενεργήθηκε μελέτη του μεταβολικού προφίλ του ορού του αίματος. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ασθενείς με NAFLD, είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης, ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST), αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, (ALT), γ-γλουταμινοτρανσφεράσης (γ- GT) και αλκαλικής φωσφατάσης (ALP).

Πίνακας 8. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών.

	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με NAFLD
Αριθμός	43	62
Ηλικία (έτη)	51 ± 7	51 ± 8
Φύλο (Α/Γ)	11/32	31/31
AST (IU/ml)	22 ± 5	34 ± 29*
ALT (IU/ml)	19 ± 7	48 ± 40*
γ-GT (IU/ml)	18 ± 6	41 ± 36*
ALP (IU/ml)	63 ± 15	72 ± 24*
TBIL (mg/dl)	0.5 ± 0.2	0.72 ± 0.36
ALB (g/dl)	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.3
Γλυκόζη (mg/dl)	87 ± 9	97 ± 13*
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.92 ± 0.15	0.88 ± 0.15

* p<0.05

Μεταβολομική ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι μελέτες του μεταβολικού προφίλ μπορούν να γίνουν με στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση και μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση. Στη στοχευμένη ανάλυση, γίνεται επιλογή συγκεκριμένων μεταβολιτών για ποσοτικοποίηση, ενώ η μη στοχευμένη προσέγγιση παρέχει πληροφορίες για όλους τους μεταβολίτες που εμφανίζονται στα φάσματα που προκύπτουν από τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$.

7.1.1 Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Targeted analysis)

Από την ανάλυση των φασμάτων $^1\text{H NMR}$ που ελήφθησαν από την ομάδα ελέγχου και την ομάδα των ασθενών με NAFLD, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν μέσω της χρήσης του λογισμικού Chenomx NMR Suite (έκδοση 8.4) συνολικά πενήντα τρεις μεταβολίτες. Οι τιμές συγκέντρωσης (μέση $\pm$ τυπική απόκλιση) των μεταβολιτών του ορού για κάθε ομάδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Από τους συνολικά 53 μεταβολίτες που ποσοτικοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση 37 μεταβολιτών μεταξύ των ασθενών με NAFLD και των υγιών ατόμων. Συγκεκριμένα, η διάγνωση της NAFLD συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα δύο BCAAs, ισολευκίνης και βαλίνης και των ενδιάμεσων μεταβολιτών των BCAAs, 2-οξοϊσοκαπροϊκού και 3-υδροξυϊσοβουτυρικού, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, οι μεταβολίτες που εμπλέκονται στην κετογένεση και την κετόλυση οξικό, ακετοξικό, 2-υδροξυβουτυρικό και 3-υδροξυβουτυρικό βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ασθενείς με NAFLD, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Το γαλακτικό και το πυροσταφυλικό, τα οποία είναι μεταβολίτες που εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας, επίσης αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα της NAFLD. Οι ασθενείς με NAFLD παρουσίασαν επίσης σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μεταβολιτών που σχετίζονται με τον κύκλο του ενεργοποιημένου μεθυλίου (βεταΐνη, διμεθυλαμίνη, φορμικό, μεθειονίνη, γλυκίνη, χολίνη, σαρκίνη), τον μεταβολισμό των πουρινών (υποξανθίνη) και αυξημένα επίπεδα αμινοξέων αλανίνη, ασπαρτικό, γλυκίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη. Αυξημένοι σε ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου βρέθηκαν επίσης οι μεταβολίτες καρνιτίνη, O-ακετυλοκαρνιτίνη, κρεατίνη, N,N-διμεθυλογλυκίνη, μυο-ινοσιτόλη, κινουρενίνη, και 2-οξογλουταρικό. Αντίθετα, οι ασθενείς με NAFLD παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα των αμινοξέων αργινίνη, γλουταμίνη, ορνιθίνη και σερίνη καθώς και των μεταβολιτών ακετόνη και ταυρίνη.

Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις μεταβολιτών στον ορό του αίματος ασθενών με NAFLDσε σχέση με τους υγιείς (mean $\pm$ SD)

Μεταβολίτες (uM)		NAFLD	HC	p value
		62	43	
1	2-Αμινοβουτυρικό	19.41 $\pm$ 1.18	18.47 $\pm$ 4.31	NS
2	2-Υδροξυβουτυρικό	106.35 $\pm$ 26.15	79.39 $\pm$ 19.09	<0.001
3	2-Υδροξυισοβαλερικό	10.95 $\pm$ 1.69	9.55 $\pm$ 4.16	<0.05
4	2-Οξοκαπροικό	10.67 $\pm$ 0.88	7.80 $\pm$ 3.34	<0.001
5	2-Οξογλουταρικό	29.03 $\pm$ 4.64	12.56 $\pm$ 4.50	<0.001
6	2-Οξοϊσοκαπροϊκό	20.90 $\pm$ 1.75	18.89 $\pm$ 5.83	<0.05
7	3-Υδροξυβουτυρικό	87.26 $\pm$ 81.57	57.99 $\pm$ 24.04	<0.05
8	3-Υδροξυϊσοβουτυρικό	11.80 $\pm$ 1.38	6.87 $\pm$ 2.56	<0.001
9	3-Υδροξυισοβαλερικό	8.91 $\pm$ 1.79	10.66 $\pm$ 5.48	NS
10	3-Μεθυλ-2-οξοβαλερικό	10.65 $\pm$ 1.23	10.10 $\pm$ 2.38	NS
11	Οξικό	68.78 $\pm$ 22.64	50.90 $\pm$ 19.78	<0.001
12	Ακετοξικό	46.59 $\pm$ 35.38	25.70 $\pm$ 16.99	<0.001
13	Ακετόνη	18.52 $\pm$ 11.63	28.26.81	<0.05
14	Αλανίνη	546.18 $\pm$ 100.44	488.77 $\pm$ 99.62	<0.01
15	Αργινίνη	103.10 $\pm$ 5.07	185.21 $\pm$ 49.02	<0.001
16	Ασπαραγίνη	60.80 $\pm$ 5.36	64.15 $\pm$ 15.54	NS
17	Ασπαρτικό	49.41 $\pm$ 4.55	38.51 $\pm$ 9.50	<0.001
18	Βεταΐνη	84.45 $\pm$ 17.41	69.73 $\pm$ 15.05	<0.001
19	Καρνιτίνη	53.52 $\pm$ 11.48	40.93 $\pm$ 9.06	<0.001
20	Χολίνη	16.70 $\pm$ 3.97	12.42 $\pm$ 4.20	<0.001
21	Κιτρικό	152.35 $\pm$ 30.89	150.16 $\pm$ 32.67	NS
22	Κρεατίνη	47.00 $\pm$ 19.99	30.66 $\pm$ 15.56	<0.001
23	Διμεθυλαμίνη	8.79 $\pm$ 2.93	5.72 $\pm$ 3.18	<0.001
24	Μυρμηκικό	45.84 $\pm$ 12.98	32.79 $\pm$ 14.16	<0.001
25	Γλουταμικό	110.89 $\pm$ 12.39	102.92 $\pm$ 53.59	NS
26	Γλουταμίνη	492.90 $\pm$ 53.34	530.44 $\pm$ 89.86	<0.05
27	Γλυκίνη	341.40 $\pm$ 92.91	308.45 $\pm$ 51.08	<0.05
28	Ιστιδίνη	89.92 $\pm$ 21.33	94.56 $\pm$ 22.02	NS
29	Υποξανθίνη	20.82 $\pm$ 2.56	15.16 $\pm$ 5.44	<0.001
30	Ισοβουτυρικό	7.97 $\pm$ 0.96	8.37 $\pm$ 2.71	NS
31	Ισολευκίνη	76.97 $\pm$ 17.00	67.56 $\pm$ 13.01	<0.01
32	Κυνουρενίνη	4.15 $\pm$ 0.57	2.96 $\pm$ 0.53	<0.001
33	Γαλακτικό	2822.8 $\pm$ 835.2	2336.7 $\pm$ 606.1	<0.01
34	Λευκίνη	142.90 $\pm$ 28.05	152.38 $\pm$ 30.90	NS
35	Λυσίνη	171.52 $\pm$ 16.08	180.02 $\pm$ 34.85	NS
36	Μηλονικό	17.06 $\pm$ 2.33	16.68 $\pm$ 5.05	NS
37	Μαννόζη	77.11 $\pm$ 8.22	76.17 $\pm$ 22.09	NS
38	Μεθαναλίνη	42.41 $\pm$ 7.71	32.76 $\pm$ 7.57	<0.001
39	Μυο-ινοσιτόλη	58.34 $\pm$ 3.27	44.31 $\pm$ 8.44	<0.001

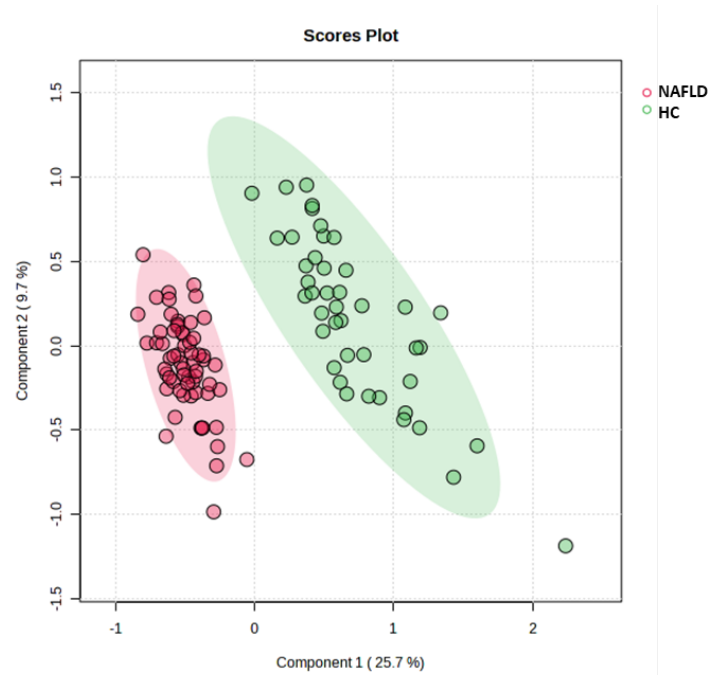
40	N,N-Διμεθυλογλυκίνη	5.14 ± 0.94	3.59 ± 1.17	<0.001
41	O-Ακετυλοκαρνιτίνη	13.90 ± 4.21	8.99 ± 3.57	<0.001
42	Ορνιθίνη	63.47 ± 8.02	72.56 ± 26.03	<0.05
43	Φαινυλαλανίνη	78.54 ± 12.49	77.36 ± 21.06	NS
44	Προλίνη	221.18 ± 20.22	238.43 ± 69.36	NS
45	Πυροσταφυλικό	101.00 ± 46.48	51.63 ± 21.24	<0.001
46	Σαρκοζίνη	7.01 ± 1.36	3.61 ± 1.63	<0.001
47	Σερίνη	177.18 ± 10.38	196.81 ± 22.86	<0.001
48	Ηλεκτρικό	13.72 ± 3.87	12.66 ± 5.22	NS
49	Ταυρίνη	104.01 ± 7.31	146.19 ± 27.36	<0.001
50	Θρεονίνη	197.34 ± 11.05	210.70 ± 44.25	NS
51	Τρυπτοφάνη	45.16 ± 4.37	34.88 ± 12.31	<0.001
52	Τυροσίνη	88.09 ± 17.67	70.72 ± 13.91	<0.001
53	Βαλίνη	276.78 ± 45.74	246.33 ± 36.65	<0.001

7.1.2 Μη Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Untargeted analysis)

Για την μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, το σύνολο των δεδομένων που περιλάμβανε τις μετρήσεις των επιπέδων (53) μεταβολιτών ορού που ελήφθησαν από τα φάσματα των 62 ασθενών με NAFLD και 43 υγιών ατόμων επεξεργάστηκε με το στατιστικό πρόγραμμα MetaboAnalyst v.4.0. Πριν από την πολυπαραγοντική ανάλυση, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών ομαλοποιήθηκαν με το ανωτέρω πρόγραμμα. Ακολουθώντας, στα δεδομένα εφαρμόστηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για την συνολική παρατήρηση των δεδομένων, τον έλεγχο της ομοιογένειας των ομάδων, τον εντοπισμό αποκλινόντων δεδομένων που βρίσκονται εκτός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95% και τον εντοπισμό πιθανών τάσεων διαχωρισμού μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων.

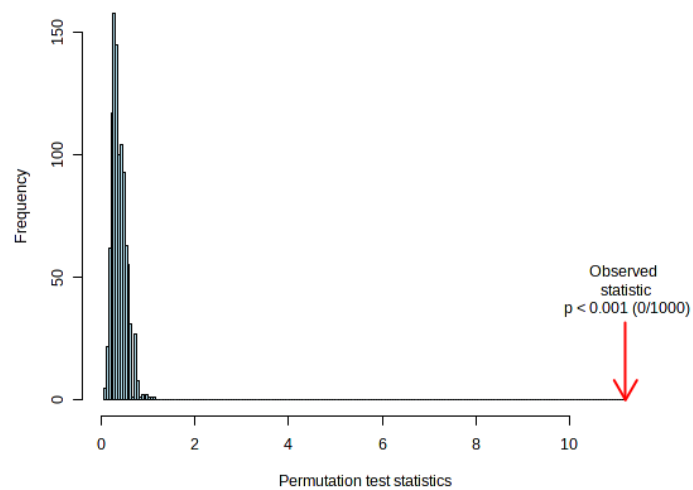
Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση PLS-DA, η οποία ανέδειξε στατιστικά σημαντικό διαχωρισμό των δύο ομάδων, των ασθενών με NAFLD και της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 13). Η ικανότητα του μοντέλου να διαχωρίζει τις ομάδες αξιολογήθηκε μέσω δύο μετρήσεων ποιότητας: $R^2 = 0,949$ που αντιπροσωπεύει την εξηγούμενη παραλλαγή και $Q^2=0,892$ που δείχνει την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές αναδιάταξης με 1000 επαναλήψεις και η στατιστικά σημαντική τιμή p ($p < 0,001$) που προέκυψε υποστηρίζει περαιτέρω την εγκυρότητα του μοντέλου. Οι μεταβολίτες που συνέβαλαν σημαντικά στον διαχωρισμό των δυο ομάδων απεικονίζονται στα διαγράμματα συντελεστών VIP.

Εικόνα 13. Ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών PLS-DA που λήφθηκε για 62 ασθενείς με NAFLD και 43 υγιείς



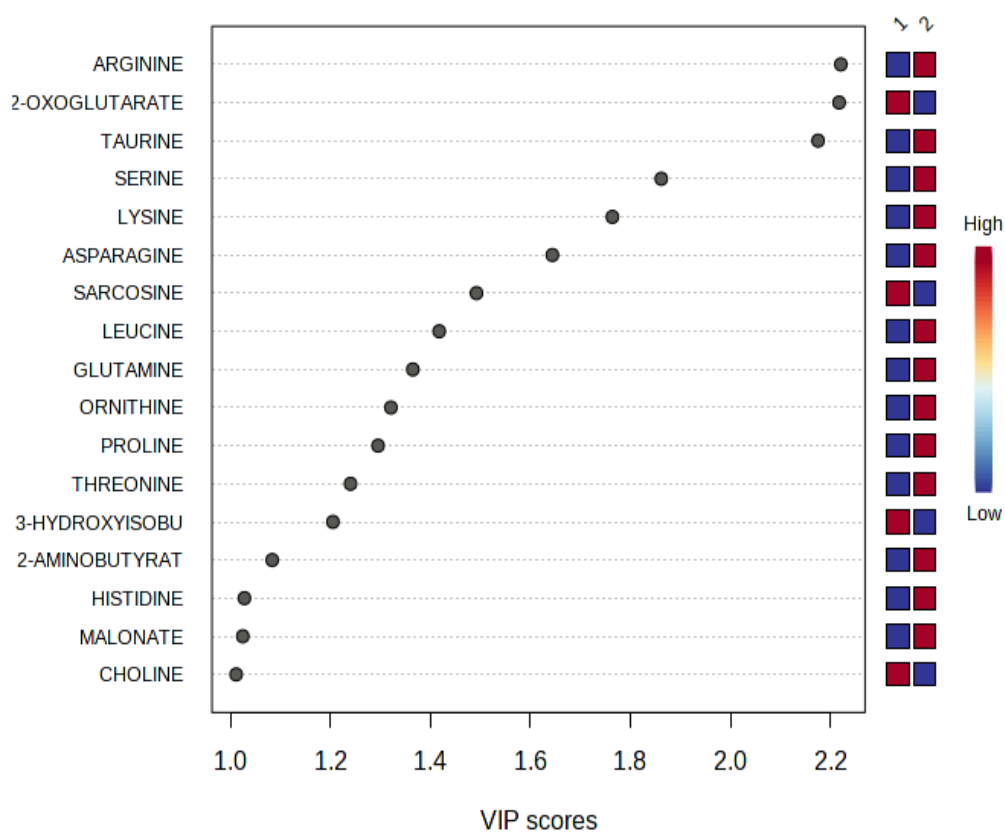
Εικόνα 14 Δοκιμές αναδιάταξης- ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών PLS-DA

Empirical p value: $p < 0.001$ (0/1000)



Συνολικά, δεκαεπτά μεταβολίτες με τιμές $VIP \geq 1$, συμβάλλουν στο διαχωρισμό που παρατηρείται στις γραφικές παραστάσεις του μοντέλου PLS-DA

Εικόνα 15 Διαγράμματα συντελεστών VIP PLS-DA



1, NAFLD; 2, Ομάδα ελέγχου

7.2 Ανάλυση λιπιδικού προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών

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. Οι ομάδες μελέτης επιλέχθηκαν έτσι ώστε να μη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο και τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού (επίπεδα χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL και LDL-χοληστερόλης).

Πίνακας 10. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών.

	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με NAFLD^α	Ασθενείς με CHD^β
Αριθμός	50	51	40
Ηλικία (έτη)	54 ± 12	51 ± 12	55 ± 9
Φύλο (Α/Γ)	26/24	23/28	22/18
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	197.94 ± 35.98	207.55 ± 45.99	204.25 ± 46.93
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	121.92 ± 38.24	132.41 ± 42.76	131.40 ± 42.23
HDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	48.90 ± 8.56	51.29 ± 10.89	48.42 ± 8.84
LDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	124.66 ± 31.22	130.02 ± 39.78	129.55 ± 44.82

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

7.2.1 Ανάλυση της λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών στις υπό μελέτη ομάδες

Στον Πίνακα 11 και τον Πίνακα 12 παρουσιάζεται ανάλυση της λιπιδικής σύστασης των HDL στα δομικά συστατικά τους στους υγιείς, στους ασθενείς με NAFLD και στους ασθενείς με CHD. Στην Εικόνα 16 φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR του εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών. Από το φάσμα αυτό ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τα λιπίδια του πυρήνα, δηλαδή η εστεροποιημένη χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια, καθώς και τα λιπίδια επιφανείας, δηλαδή η ελεύθερη χοληστερόλη και φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλοχολίνη, η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοϊνositόλη, τα πλασμαλογόνα, η σφιγγομυελίνη και τα υπόλοιπα σφιγγολιπίδια που αντιστοιχούν κυρίως στα κεραμίδια. Η σύσταση των λιπιδίων εκφράστηκε ως % σύσταση των συνολικών λιπιδίων του πυρήνα και των λιπιδίων της επιφανείας. Τέλος, προσδιορίστηκαν οι λόγοι ελεύθερη χοληστερόλη/φωσφολιπίδια, εστεροποιημένη/ελεύθερη χοληστερόλη και ο λόγος φωσφατιδυλοχολίνη/σφιγγομυελίνη.

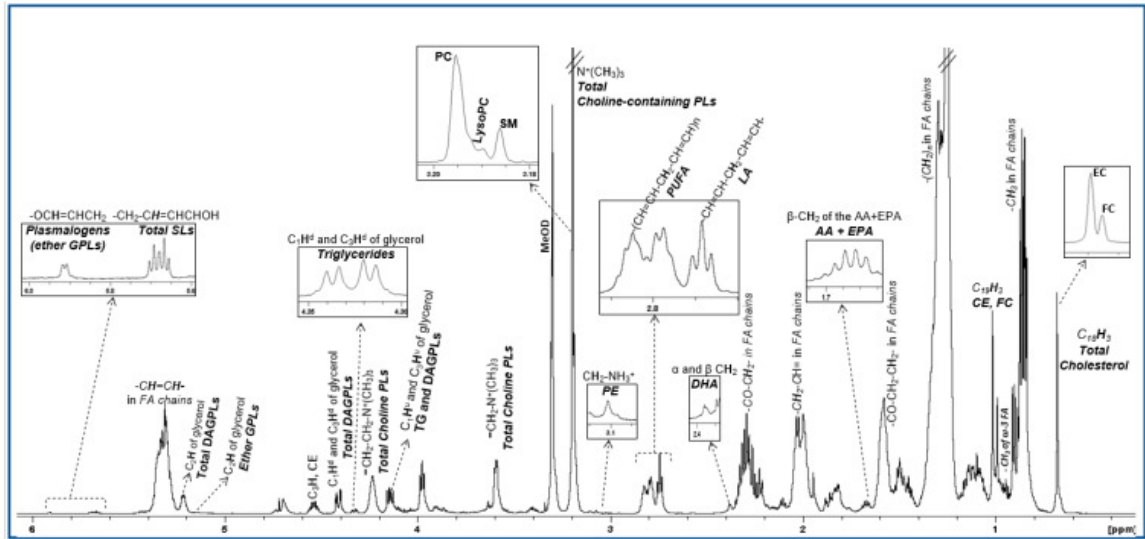
Πίνακας 11. Λιπιδική Σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών στις κύριες κατηγορίες λιπιδίων (moles/ 100 moles των λιπιδίων)

	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με NAFL	Ασθενείς με CHD
N	50	51	40
% Χοληστερόλη	41.87 ± 1.54	42.13 ± 1.79	40.63 ± 1.87 ^{**} , ⁺⁺⁺
Εστεροποιημένη (EC)	32.12 ± 1.37	31.98 ± 1.29	30.89 ± 1.69 ^{***} , ⁺⁺⁺
Ελεύθερη (FC)	9.75 ± 0.84	10.15 ± 0.96*	9.74 ± 0.86 ⁺
% Τριγλυκερίδια (TG)	4.65 ± 1.12	4.74 ± 1.72	5.93 ± 1.11 ^{***} , ⁺⁺⁺
% Φωσφολιπίδια (PLs)	53.47 ± 1.66	53.14 ± 2.06	53.44 ± 1.83
% Λιπίδια του Πυρήνα	36.77 ± 1.75	36.72 ± 1.82	36.82 ± 1.85
% Λιπίδια της Επιφανείας	63.23 ± 1.75	63.28 ± 1.82	63.18 ± 1.85
Ελεύθερη χοληστερόλη/ Φωσφολιπίδια	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02*	0.18 ± 0.02 ⁺
Εστεροποιημένη/Ελεύθερη Χοληστερόλη	3.32 ± 0.34	3.18 ± 0.30*	3.20 ± 0.33

* 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 NAFL

Εικόνα 16. Φάσμα ^1H NMR εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών

(Πηγή: Kostara et al. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 8835.)**[250]**



Πίνακας 12. Σύσταση φωσφολιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών (moles/ 100 moles των λιπιδίων)

	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με NAFL	Ασθενείς με CHD
N	50	51	40
% Φωσφολιπίδια (PLs)	53.56 ± 2.70	53.13 ± 4.26	53.15 ± 4.26
• Γλυκεροφωσφολιπίδια (GPLs)	41.37 ± 1.55	39.98 ± 2.22**	41.99 ± 2.14 ⁺⁺⁺
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)	34.22 ± 1.35	33.13 ± 2.77*	33.41 ± 2.17
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC)	2.36 ± 0.40	2.69 ± 0.56**	2.70 ± 0.53**
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)	1.24 ± 0.29	0.94 ± 0.26***	0.99 ± 0.28***
Φωσφατιδυλοινωσιτόλη (PI)	2.13 ± 0.58	1.47 ± 0.43***	2.50 ± 1.21 ^{*,+++}
Υπόλοιπα Λιπίδια ^α	1.59 ± 1.27	1.78 ± 1.76	2.40 ± 1.74*
• Αιθερικά Γλυκερολιπίδια (Ether GLs)	4.99 ± 0.84	5.34 ± 1.03	4.39 ± 0.94 ^{**,+++}
Πλασμαλογόνα	1.77 ± 0.30	1.71 ± 0.37	1.88 ± 0.48 ⁺
Υπόλοιπα Αιθερικά Λιπίδια ^β	3.22 ± 0.82	3.63 ± 0.96*	2.51 ± 0.83 ^{***,+++}
• Σφιγγολιπίδια (SLs)	7.11 ± 0.69	7.82 ± 0.71***	7.06 ± 0.89 ^{***,+++}
Σφιγγομυελίνη (SM)	6.19 ± 0.97	6.34 ± 1.01	5.91 ± 0.89 ⁺
Υπόλοιπα Σφιγγολιπίδια ^γ	0.92 ± 0.72	1.48 ± 0.78***	1.15 ± 0.59 ⁺
Φωσφατιδυλοχολίνη/ Σφιγγομυελίνη	4.61 ± 0.50	5.01 ± 0.78**	4.56 ± 0.55 ⁺⁺

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου + p<0.05, ++ p<0.01 +++ p<0.001 σε σύγκριση με τους ασθενείς με NAFL

α: κυρίως φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλογλυκερόλη, β: PAF, γ: κυρίως κεραμίδιο

Επιπλέον, στον Πίνακα 13 παρουσιάζεται το προφίλ των λιπαρών οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών στις υπό μελέτη ομάδες. Συνολικά, από το φάσμα ^1H NMR 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.

Πίνακας 13. Προφίλ Λιπαρών Οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών (moles/ 100 moles των λιπιδίων)

Λιπαρά Οξέα	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με NAFLD	Ασθενείς με CHD
	50	51	40
% Κορεσμένα	39.42 ± 3.37	$41.07 \pm 3.30^*$	$45.18 \pm 5.11^{***,+++}$
% Ακόρεστα	60.58 ± 3.37	$58.93 \pm 3.30^*$	$54.82 \pm 5.11^{***,+++}$
% Μονοακόρεστα	7.98 ± 2.17	8.75 ± 3.04	$9.58 \pm 2.26^{**}$
% Πολυακόρεστα	52.60 ± 3.12	$50.18 \pm 3.29^{**}$	$45.24 \pm 5.41^{***,+++}$
➤ Λινελαϊκό Οξύ	19.57 ± 1.76	$16.72 \pm 2.07^{***}$	$15.69 \pm 2.17^{***,+}$
➤ Εικοσαπεντανοϊκό και Αραχιδονικό Οξύ	12.28 ± 1.39	$9.85 \pm 1.68^{***}$	$9.14 \pm 0.88^{***,+}$
➤ Εικοσιδιεξαενοϊκό Οξύ	4.09 ± 0.76	$3.33 \pm 0.61^{***}$	$2.86 \pm 0.47^{***,+++}$
Μέσο Μήκος Αλυσίδας Λιπαρών Οξέων	16.97 ± 1.71	$15.32 \pm 0.84^{***}$	15.18 ± 2.35
Κορεσμένα/Ακόρεστα	0.66 ± 0.10	0.70 ± 0.10	$0.84 \pm 0.18^{***,+++}$
Κορεσμένα/Πολυακόρεστα	0.76 ± 0.11	$0.82 \pm 0.11^*$	$1.03 \pm 0.25^{***,+++}$
* $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου + $p < 0.05$ και ++ $p < 0.01$ σε σύγκριση με τους ασθενείς με NAFLD			

7.2.2 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 στο προφίλ των λιπαρών οξέων.

Στο κλάσμα της HDL των ασθενών με NAFLD παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της περιεκτικότητας σε φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και σε φωσφατιδυλινωσιτόλη σε σχέση με των υγιών και αύξηση της περιεκτικότητας της ελεύθερης χοληστερόλης, λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, υπόλοιπων αιθερικών λιπιδίων και των ολικών σφιγγολιπιδίων. Η αύξηση των σφιγγολιπιδίων οφείλεται κυρίως στον εμπλουτισμό του σωματιδίου των HDL με τα υπόλοιπα σφιγγολιπίδια και κυρίως με κεραμίδια. Επιπρόσθετα, ο λόγος φωσφατιδυλοχολίνη/σφιγγομυελίνη ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος από ότι στην ομάδα ελέγχου.

Σε ό,τι αφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων, στατιστικά σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν τόσο στα συνολικά κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα όσο και στα επιμέρους πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα σε κορεσμένα και μειωμένη σε ακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, η % περιεκτικότητα του σωματιδίου σε λινελαϊκό οξύ, σε εικοσιπεντανοϊκό οξύ και αραχιδονικό οξύ και εικοσιδιεξανοϊκό οξύ ήταν σε χαμηλότερα ποσοστά στους ασθενείς με NAFLD σε σχέση με τους υγιείς και το μέσο μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων ήταν μικρότερο. Αντίθετα, οι λόγοι κορεσμένα/ακόρεστα καθώς και κορεσμένα/πολυακόρεστα ήταν μεγαλύτεροι στην ομάδα της NAFLD εν συγκρίσει με την ομάδα ελέγχου.

7.2.3 Λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών των ασθενών με NAFLD και ασθενών με Εγκατεστημένη Καρδιαγγειακή Νόσο

Σε ό,τι αφορά τη σύγκριση της λιπιδικής σύστασης της HDL λιποπρωτεΐνης των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος με αυτή των ατόμων με επιβεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο παρατηρήθηκαν κυρίως διαφορές που αφορούν την περιεκτικότητα της HDL στα συνολικά γλυκεροφωσφολιπίδια, φωσφατιδυλινωσιτόλη, υπόλοιπα αιθερικά λιπίδια και στα σφιγγολιπίδια. Ακόμη, διαφορές παρατηρήθηκαν και στο προφίλ των λιπαρών οξέων.

Η HDL των ατόμων με NAFLD παρουσίαζε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών γλυκεροφωσfolιπιδίων και συγκεκριμένα φωσφατιδυλγαινόλης σε σχέση με την HDL των ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο. 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 όσο και στα κεραμίδια.

Οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν παρόμοιες μεταβολές με τους CHD σε σχέση με τους υγιείς όσον αφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 12, η περιεκτικότητα του σωματιδίου της HDL των ασθενών με CHD σε κορεσμένα αυξήθηκε, ενώ σε ακόρεστα, πολυακόρεστα και ειδικά στο λινελαϊκό εικοσιπεντανοϊκό οξύ, αραχιδονικό οξύ και εικοσιδιεξανοϊκό οξύ μειώθηκε σε σύγκριση με τους ασθενείς με NAFLD. Επιπλέον, το μέσο μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων ήταν μικρότερο στην ομάδα ασθενών με CHD εν συγκρίσει με την ομάδα της NAFLD ενώ οι λόγοι κορεσμένα/ακόρεστα καθώς και κορεσμένα/πολυακόρεστα ήταν μεγαλύτεροι.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ το μεταβολικό προφίλ 62 ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο ήπατος διαγνωσμένη με υπερηχογράφημα άνω κοιλίας και 43 υγιών εθελοντών. Ακολούθησε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ μελέτη της λιπιδικής σύσταση των HDL σωματιδίων 51 ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο ήπατος, 40 ασθενών με εγκατεστημένη Καρδιαγγειακή Νόσο και 50 υγιών εθελοντών. Η έρευνα αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στον μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπιδίων σε ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν αλλαγές στον μεταβολισμό των διακλαδισμένων αμινοξέων (BCAAs), στη δραστηριότητα του κύκλου του κιτρικού οξέος, στη γλυκόλυση, στη σύνθεση κετονικών σωμάτων και στον μεταβολισμό των αρωματικών αμινοξέων. Επιπλέον, στην ομάδα των ασθενών με NAFLD παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση των λιπιδίων των HDL, λιποπρωτεϊνών ειδικά των φωσφολιπιδίων και των λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τους υγιείς αλλά και τους ασθενείς με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο.

8.1 Ανάλυση του μεταβολικού προφίλ του ορού του αίματος

Στην παρούσα μελέτη με την ανάλυση δειγμάτων ορού απαλλαγμένων από μακρομόρια, ποσοτικοποιήθηκαν με ακρίβεια 53 μεταβολίτες. Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε έναν ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό των μεταβολικών οδών που διαταράσσονται στην NAFLD. Ο καταβολισμός των BCAA, ο κύκλος του τρικυκλικού οξέος, ο κύκλος της ουρίας, ο μεταβολισμός των αρωματικών αμινοξέων και άλλων αμινοξέων παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές στην περίπτωση της NAFLD, υποδεικνύοντας ότι οι διαταραχές στη συνολική ομοιοστάση των αμινοξέων και στον ενεργειακό μεταβολισμό χαρακτηρίζουν την παθογένεια της νόσου.

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου, βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη θεωρούνται τα πλέον μελετημένα αμινοξέα. Εμπλέκονται όχι μόνο στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, αλλά και σε διάφορες άλλες μεταβολικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ομοιοστάσης της γλυκόζης [251]. Στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος παρουσίασαν στον ορό αξιοσημείωτα υψηλότερα επίπεδα βαλίνης και ισολευκίνης, αλλά όχι λευκίνης. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν όμως σε επιλεγμένους πληθυσμούς με NAFLD [131,252]. Συγκεκριμένα, αύξηση αυτών των δύο αμινοξέων έχει αναφερθεί σε μη παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου[131]. Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη σε έφηβους που πάσχουν από παχυσαρκία, η

βαλίνη και η ισολευκίνη ήταν αυξημένες στο πλάσμα αυτών με NAFLD εν συγκρίσει των παχύσαρκων χωρίς λιπώδες ήπαρ [252]. Ωστόσο, άλλες μελέτες μεταβολικού προφίλ στον ορό ή πλάσμα ασθενών με στεάτωση αναφέρουν αυξημένα επίπεδα και των τριών BCAA [253–256]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει ότι η αύξηση και των τριών BCAA συσχετίζεται με την στεατοηπατίτιδα, παρά με την απλή στεάτωση [126]. Αυτή η διαφορά στα ευρήματα που αφορούν τα επίπεδα της λευκίνης παρατηρήθηκε και σε αναλύσεις μεταβολικού προφίλ σε ηπατικά δείγματα ασθενών με NAFLD και NASH [128,257]. Ασθενείς με στεατοηπατίτιδα παρουσίασαν αυξημένες ηπατικές συγκεντρώσεις βαλίνης και λευκίνης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ σε άλλη μελέτη η ηπατική σύνθεση και των τριών BCAA και η αύξηση τους συσχετίστηκε με την εξέλιξη από απλή στεάτωση σε NASH [128,257]. Οι διαφορές στις μεθοδολογικές προσεγγίσεις αλλά και στα ειδικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού με NAFLD ή της ομάδας ελέγχου θα μπορούσαν να εξηγήσουν εν μέρει την ασυνέπεια αυτών των ευρημάτων.

Τα BCAA είναι απαραίτητα αμινοξέα που δεν μπορούν να συντεθούν από τα ανθρώπινα κύτταρα και η αυξημένη συγκέντρωσή τους κατά τη νηστεία αντανακλά μια καταβολική κατάσταση [131]. Τα αυξημένα επίπεδα των αμινοξέων αυτών έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με την παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και τον διαβήτη τύπου 2 [258]. Αν και η συσχέτιση μεταξύ των BCAA και της αντίστασης στην ινσουλίνη έχει τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες, παραμένει ασαφές αν τα BCAA είναι υπεύθυνα για αυτή καθ' αυτή ή αποτελούν απλώς δείκτες μιας ήδη υπάρχουσας διαταραχής απόκρισης στην ινσουλίνη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη επηρεάζει τον μεταβολισμό των BCAA καταστέλλοντας τα ένζυμα που εμπλέκονται στον καταβολισμό τους [259]. Συνεπώς, ο μειωμένος καταβολισμός των BCAA, που αυξάνει τη διαθεσιμότητά τους, σε συνδυασμό με τις μεταβολικές διαταραχές που προκαλούνται από τη δυσβίωση του εντέρου και την υπερβολική πρόσληψη τροφής, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα BCAA στο πλάσμα [260]. Αντιστρόφως, τα αυξημένα επίπεδα BCAA ενδέχεται να συμβάλλουν στην ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη, στη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ και στη δυσλειτουργία των μιτοχondρίων στη NAFLD [137]. Η ενεργοποίηση της γλυκονεογένεσης από τα BCAA ή η επίμονη ενεργοποίηση του συμπλόκου 1 της mTOR (mTORC1) από τα BCAA και η επακόλουθη φωσφορυλίωση του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης 1 (IRS-1) θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αναστολή της σηματοδότησης της ινσουλίνης [137,259]. Επιπλέον, οι μεταβολές στον μεταβολισμό των BCAA όχι μόνο ενεργοποιούν ένζυμα όπως η ATP-κιτρική λυάση ATP (ACL) που ρυθμίζουν τη de novo λιπογένεση, αλλά παρέχουν υποστρώματα λιπογένεσης που οδηγούν σε αυξημένη αποθήκευση λιπιδίων [261]. Επιπροσθέτως, η αύξηση των BCAA προάγει την μεταφορά των BCAA στους σκελετικούς μυς, με επακόλουθο την αύξηση των υποστρωμάτων στα μιτοχόνδρια και τελικά την αναποτελεσματική οξείδωση των λιπαρών οξέων [260]. Η αυξημένη ροή οξείδωσης των

BCAA στους σκελετικούς μυς προάγει επίσης τη συσσώρευση τοξικών ενδιάμεσων λιπιδίων και οδηγεί στην παραγωγή του 3-υδροξυϊσοβουτυρικού (3-HIB) [209]. Το 3-HIB είναι ένας μεταβολίτης της βαλίνης με παρακρινή δράση που ενεργοποιεί τους μεταφορείς λιπαρών οξέων του ενδοθηλίου και αυξάνει την πρόσληψη λιπαρών οξέων [209]. Στην παρούσα μελέτη, αυτός ο μεταβολίτης ήταν αυξημένος στους ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ένα εύρημα σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε άτομα με αντίσταση στην ινσουλίνη [262].

Στην μελέτη μας, ένα ακόμα ενδιαφέρον εύρημα ενδεικτικό της διαταραχής του μεταβολισμού των BCAA στην περίπτωση της NAFLD ήταν η αύξηση των επιπέδων του 2-οξοϊσοκαπροϊκού οξέος και του 2-υδροξυ ισοβαλερικού οξέος. Πρόκειται για ενδιάμεσα προϊόντα του καταβολισμού της λευκίνης και τα αυξημένα επίπεδά τους υποδεικνύουν διαταραχές στα μεταβολικά μονοπάτια της λευκίνης. Αυτά τα ευρήματα θα μπορούσαν εν μέρει να εξηγήσουν τα αμετάβλητα επίπεδα της λευκίνης που παρατηρήθηκαν στην ανάλυσή μας. Στους ασθενείς με NAFLD, έχουν αναφερθεί διαφορές στα επίπεδά τους σε ασθενείς με ίνωση σε σύγκριση με άτομα με στεάτωση, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ασθενών με στεάτωση και της ομάδας ελέγχου [263]. Αν και ο ακριβής τους ρόλος στην αντίσταση στην ινσουλίνη δεν είναι πλήρως κατανοητός, έχει αναφερθεί ότι τα ενδιάμεσα προϊόντα του καταβολισμού των BCAA και όχι συγκεκριμένα τα αυξημένα επίπεδα των BCAA, ρυθμίζουν τη μεταφορά γλυκόζης και την ευαισθησία στην ινσουλίνη [264].

Τα επίπεδα των αρωματικών αμινοξέων έχουν επίσης βρεθεί πως συσχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την εμφάνιση του T2DM [134,265]. Έχουν αναφερθεί υψηλότερα επίπεδα τυροσίνης και φαινυλαλανίνης σε ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, τα οποία όμως συσχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 [134]. Στη μελέτη μας, οι ασθενείς με NAFLD παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις τυροσίνης και τρυπτοφάνης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα φαινυλαλανίνης. Αυτή η αύξηση των επιπέδων τυροσίνης έχει καταγραφεί συστηματικά σε πολλαπλές μελέτες σε ασθενείς με λιπώδες ήπαρ [126,254,255,266]. Ωστόσο, αντίστοιχη αύξηση στα επίπεδα της τρυπτοφάνης μεταξύ αυτών των ασθενών σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου έχει αναφερθεί σε μικρότερο αριθμό μελετών [252,254]. Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που συνδέει τα επίπεδα της τυροσίνης με την αντίσταση στην ινσουλίνη δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Η αντίσταση στην ινσουλίνη πιθανά αυξάνει τα επίπεδα τυροσίνης μέσω της αύξησης του α-κετοβουτυρικού οξέος, ενός παραπροϊόντος της αποδόμησης της μεθειονίνης, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να αυξάνει την κυστεΐνη και να καταστέλλει τον καταβολισμό της τυροσίνης [136]. Μια μελέτη σε ασθενείς με NAFLD και παχυσαρκία ανέφερε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων τυροσίνης και της περιεκτικότητας του ήπατος σε λίπος, μετά από προσαρμογή για την ηλικία,

το φύλο, το ΔΜΣ και τον δείκτη HOMA-IR [135]. Μάλιστα, αποτελέσματα αναλύσεων σε ασθενείς με προχωρημένη φλεγμονή του ήπατος έδειξαν μείωση των BCAA και αύξηση της τυροσίνης με την πρόοδο της νόσου [136]. Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα τυροσίνης στη NAFLD μπορεί να αποδοθούν όχι μόνο στην αντίσταση στην ινσουλίνη, αλλά και στην εξέλιξη της νόσου προς προχωρημένα στάδια φλεγμονής.

Στα ηπατοκύτταρα ασθενών με στεάτωση έχουν παρατηρηθεί αξιοσημείωτες διαφορές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και κυρίως στην γλυκόλυση. Το προϊόν της γλυκόλυσης, το πυροσταφυλικό οξύ, ήταν αυξημένο στην ομάδα ασθενών με NAFLD, ένα εύρημα που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες [255,263]. Επιπρόσθετα, μια μελέτη έδειξε ότι μόνο ασθενείς με NASH είχαν αυξημένα επίπεδα πυροσταφυλικού οξέος συγκριτικά με ασθενείς με απλή στεάτωση [126]. Το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί να μετατραπεί σε ακετυλο-CoA από την πυροσταφυλική αφυδρογονάση για να τροφοδοτήσει τον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA). Μια εναλλακτική μεταβολική οδός για το πυροσταφυλικό οξύ είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος, η οποία μάλιστα έχει βρεθεί πως ενισχύεται στη λιπώδη διήθηση του ήπατος [267]. Τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος ήταν αυξημένα στον ορό των ασθενών με NAFLD, εύρημα που επίσης συμφωνεί με προηγούμενες αναλύσεις [255,268]. Συνολικά, έχει αναφερθεί ότι η NAFLD τείνει να προάγει τη γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την αύξηση του γαλακτικού οξέος και πυροσταφυλικού οξέος στον ορό ή στο πλάσμα [269]. Παράλληλα, αν και ο ακριβής ρόλος του συμπλόκου πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC) στο λιπώδες ήπαρ παραμένει ασαφής, ορισμένες μελέτες υποδηλώνουν πιθανή μείωση της δραστηριότητάς του, οδηγώντας σε ανεπαρκή καταβολισμό του πυροσταφυλικού οξέος με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή του [270]. Ακόμη, η αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος καθώς και η ανεπαρκής αποβολή γαλακτικού οξέος από την ακετυλιωμένη LDH-B, καταστάσεις που έχουν παρατηρηθεί στη λιπώδη νόσο του ήπατος, θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος [267].

Μεταβολές μεταξύ των ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και της ομάδας ελέγχου παρατηρήθηκαν επίσης και στα επίπεδα των κετονοσωμάτων. Συγκεκριμένα, το ακετοξικό, το 2-υδροξυβουτυρικό οξύ και το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ παρουσίασαν αύξηση, ενώ η ακετόνη ήταν μειωμένη στους ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η σχέση μεταξύ της κετογένεσης και της NAFLD παραμένει ασαφής λόγω των ασυνεπειών στα ευρήματα προηγούμενων μελετών. Συγκεκριμένα, σε αρχικές έρευνες και συγκριτικές μελέτες παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα β-υδροξυβουτυρικού οξέος (βHB) στο πλάσμα νηστείας σε παχύσαρκους ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με υγιή άτομα φυσιολογικού βάρους [271,272]. Μία άλλη ανάλυση μεταβολικού προφίλ βασισμένη σε ¹H-NMR αποκάλυψε ότι το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ και η ακετόνη μειώνονται σε ασθενείς με στεάτωση [263]. Αντιθέτως, άλλες μελέτες ανέφεραν αυξημένα επίπεδα συνολικών κετονοσωμάτων στο

πλάσμα νηστείας, συμπεριλαμβανομένων του β-υδροξυβουτυρικού οξέος (βΗΒ), της ακετοακετόνης και της ακετόνης, σε ασθενείς με NAFLD που διαγνώστηκαν με τον έμμεσο δείκτη με FLI> 60 [273]. Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διαφορές στον τρόπο ταξινόμησης της NAFLD, καθώς και στα διαφορετικά μεταβολικά προφίλ των υπό μελέτη ομάδων. Επιπλέον, μια πιθανή εξήγηση για αυτές τις διαφορές είναι ότι η κετογένεση αρχικά αυξάνεται στα αρχικά στάδια της NAFLD λόγω της αυξημένης ροής λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Ωστόσο, καθώς η νόσος εξελίσσεται σε στεατοηπατίτιδα και ίνωση, το μεταβολικό μονοπάτι της κετογένεσης ενδέχεται να διαταράσσεται [271]. Με αυτή την προσέγγιση συμφωνούν τα ευρήματα μιας Φινλανδικής μελέτης, στην οποία τα άτομα με απλή στεάτωση είχαν υψηλότερα επίπεδα κετονών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, τα άτομα με στεατοηπατίτιδα παρουσίασαν μειωμένη κετογένεση [274]. Αν και η κετογένεση θεωρείται ένας αποτελεσματικός τρόπος για την απομάκρυνση της περίσσειας των λιπαρών οξέων από το ήπαρ, η διαταραχή της μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικές μεταβολικές συνέπειες, όπως αυξημένη γλυκονογένεση, DNL και οξειδωτικό στρες [271]. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να συμβάλλουν τελικά στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD.

Η καρνιτίνη και η Ο-ακετυλοκαρνιτίνη αυξήθηκαν σε ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Αν και ένας μικρός αριθμός ερευνητών έχει αναφέρει αλλαγές στα επίπεδα καρνιτίνης σε ασθενείς με λιπώδες ήπαρ, τα ευρήματά μας συμφωνούν με αυτά προηγούμενων μελετών [128,266]. Η καρνιτίνη διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και στην παραγωγή ενέργειας, και η έλλειψή της μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της ομοιόστασης των λιπιδίων [275]. Η κύρια λειτουργία της περιλαμβάνει τη μεταφορά μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια ως εστέρες ακυλοκαρνιτίνης για τη β-οξείδωση, μία διαδικασία που τελικά παράγει ATP μέσω του κύκλου του TCA ή οδηγεί στο σχηματισμό κετονικών σωμάτων [276]. Μάλιστα, τα προϊόντα της ακυλοκαρνιτίνης, τα οποία σχηματίζονται στα μιτοχόνδρια μέσω του καταβολισμού των BCAA και της αποδόμησης των λιπιδίων, έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη γλυκονογένεση [258,277]. Επιπλέον, το υψηλό φορτίο λιπιδίων, οι διαταραχές στον μεταβολισμό των λιπιδίων και η λιποτοξικότητα των μιτοχονδρίων έχει φανεί πως επηρεάζουν τα επίπεδα καρνιτίνης [278]. Οι παραπάνω μεταβολικές διαταραχές περιγράφουν τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της NAFLD και συνεπώς μπορεί να παρέχουν μια εξήγηση για την παρατηρούμενη αύξησή της καρνιτίνης στην μελέτη μας.

Παράλληλα, η παρούσα μελέτη αποκάλυψε ότι τα επίπεδα των μεταβολιτών που εμπλέκονται στον κύκλο της ουρίας επίσης μεταβάλλονται στην περίπτωση της NAFLD. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις ασπαρτικού οξέος και ορνιθίνης στους ασθενείς με NAFLD, ενώ παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων αργινίνης. Αυξημένα επίπεδα ασπαρτικού οξέος έχουν βρεθεί και σε προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς με NASH

και μάλιστα αυτός ο μεταβολίτης έχει συνδεθεί με υψηλότερο καρδιομεταβολικό κίνδυνο και κίνδυνο εμφάνισης στεατοηπατίτιδας [126,279,280]. Αν και η αύξηση της ορνιθίνης συμφωνεί με τα ευρήματα προηγούμενων ερευνών, δεν ισχύει το ίδιο για τα επίπεδα της αργινίνης που αναφέρεται ότι αυξάνονται στα άτομα με NAFLD [254,266,281]. Οι παρατηρούμενες αλλαγές στο ασπαρτικό οξύ, την ορνιθίνη και την αργινίνη εντός του κύκλου της ουρίας υποδηλώνουν διαταραχή στα αρχικά στάδια του κύκλου. Πράγματι, αλλαγές στα ένζυμα του κύκλου της ουρίας έχουν αναφερθεί σε πειραματικά μοντέλα αλλά και στους ασθενείς με NAFLD [282–284]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ηπατική έκφραση και δραστηριότητα τόσο της τρανσκαρβαμυλάσης της ορνιθίνης (OTC) όσο και της συνθετάσης φωσφορικού καρβαμοϋλίου 1 (CPS1) είναι μειωμένες στην περίπτωση της NAFLD [282,284]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η OTC καταλύει τη μετατροπή της ορνιθίνης σε κιτρουλίνη [282]. Ωστόσο, η μειωμένη δραστηριότητα της OTC έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ορνιθίνης, εξηγώντας τα αυξημένα επίπεδά της. Τελικά, η μειωμένη μετατροπή της ορνιθίνης σε κιτρουλίνη θα μπορούσε να εμποδίσει την παραγωγή αργινίνης, συμβάλλοντας στη παρατηρούμενη μείωση. Η μειωμένη δραστηριότητα της CPS1, του πρώτου ενζύμου του κύκλου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση φωσφορικού καρβαμοϋλίου, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια σειρά μεταβολών, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της συνολικής λειτουργίας του κύκλου της ουρίας [282].

Ο κύκλος ενεργοποιημένου μεθυλίου (One carbon metabolism-1C) αναφέρεται σε μια σειρά μεταβολικών οδών που περιλαμβάνουν τη μεταφορά μίας μεθυλομάδας με τη μεσολάβηση του φυλλικού οξέος. Η κύρια λειτουργία του είναι η παραγωγή μεθυλομάδων και η διευκόλυνση της μεταφοράς τους μέσω της σερίνης ή του μυρμηκικού σε 5-μεθυλοτετραϋδροφυλλικό οξύ για την αναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης [285]. Πέρα από αυτήν την βασική λειτουργία, ο κύκλος ενεργοποιημένου μεθυλίου συμμετέχει στον μεταβολισμό διαφόρων ενώσεων, όπως η μεθειονίνη, η χολίνη, η σερίνη, η γλυκίνη, η ιστιδίνη, η τρυπτοφάνη και τα νουκλεοτίδια [285]. Στην παρούσα ανάλυση του μεταβολικού προφίλ παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα μεθειονίνης, βεταΐνης, γλυκίνης, σερίνης και χολίνης των ασθενών με NAFLD υποδηλώνοντας μία πιθανή διαταραχή στο μεταβολισμό τους. Συγκεκριμένα, τα άτομα της ομάδας της NAFLD παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα μεθειονίνης, βεταΐνης, γλυκίνης και χολίνης, ενώ τα επίπεδα σερίνης ήταν μειωμένα σε σύγκριση με τα υγιή άτομα.

Από τα παραπάνω ευρήματα, μόνο οι διαφορές στη μεθειονίνη και τη σερίνη είναι σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες [254,258,279,281]. Τα επίπεδα της βεταΐνης και της γλυκίνης έχει αναφερθεί ότι είναι μειωμένα στους ασθενείς με NAFLD, ενώ τα ευρήματα σχετικά με τη χολίνη είναι περιορισμένα και δεν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων [131,254,268,269,286]. Η μείωση της σερίνης είναι μια σημαντική παρατήρηση που

υποδηλώνει πιθανή διαταραχή στην οδό του φυλλικού οξέος. Αυτό συμβαίνει επειδή η σερίνη παίζει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή παραγώγων του φυλλικού οξέος απαραίτητων για την αναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης και άλλες σημαντικές λειτουργίες [287]. Συνοπτικά, αυτό το εύρημα σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες μεταβολές υποδεικνύουν μία πιθανή διαταραχή στο συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να καθοριστεί ο ακριβής παράγοντας που συμβάλλει σε αυτήν.

Η έρευνα δείχνει ότι τόσο η έλλειψη χολίνης όσο και η έλλειψη μεθειονίνης συμβάλλουν στη NAFLD, με τη χολίνη να είναι πιο σημαντική. Ζωικά μοντέλα που στερούνται χολίνης αναπτύσσουν στεάτωση, φλεγμονή και ίνωση, μιμούμενα τη NAFLD [288]. Οι μοριακοί μηχανισμοί στα ζωικά μοντέλα με έλλειψη μεθειονίνης-χολίνης έχουν πολλές ομοιότητες με αυτούς της ανάπτυξης NASH στον άνθρωπο, ωστόσο δεν συνδέονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη [289].

Ένα εύρημα σε αυτήν την ανάλυση με κλινική εφαρμογή μάλιστα είναι τα μειωμένα επίπεδα ταυρίνης που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [138,257,268]. Η ταυρίνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδοκυττάριο αμινοξύ, το οποίο διαδραματίζει ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών στον οργανισμό. Συμμετέχει στη σύζευξη των χολικών οξέων και στη ρύθμιση της ωσμωτικής ισορροπίας. Επιπλέον, η ταυρίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της σηματοδότησης του ασβεστίου, στην άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες και στη σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών [290]. Μάλιστα, η ταυρίνη έχει αναδειχθεί ως μια πιθανή θεραπευτική επιλογή στη NAFLD [291,292]. Σε μελέτες με ζωικά μοντέλα, έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ηπατική στεάτωση μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης και της ευεργετικής επίδρασης στον μεταβολισμό των λιπιδίων [292]. Επιπλέον, η μυοϊνοσιτόλη, ένας άλλος μεταβολίτης που εμπλέκεται στην ωσμωρύθμιση όπως η ταυρίνη, έχει δείξει βελτίωση στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στην ηπατική στεάτωση σε ασθενείς με NAFLD [293,294]. Ωστόσο, στη μελέτη μας η μυοϊνοσιτόλη ήταν αυξημένη σε ασθενείς με NAFLD, ενώ δεν έχουν αναφερθεί αλλαγές στη συγκέντρωσή της από προηγούμενες ολοκληρωμένες αναλύσεις.

Η αλανίνη συμμετέχει σε πλήθος μεταβολικών διεργασιών. Λειτουργεί ως ενδιάμεσος μεταβολίτης στον κύκλο γλυκόζης-αλανίνης και ως φορέας αζώτου, υποστηρίζοντας την αποτοξίνωση της αμμωνίας [295]. Κατά τη διάρκεια περιόδων ενεργειακής ζήτησης, ο σκελετικός μυς μεταβολίζει τη γλυκόζη για την παραγωγή πυροσταφυλικού, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε αλανίνη από το ένζυμο αμινοτρανσφεράση της αλανίνης. Η αλανίνη μεταφέρεται στο ήπαρ όπου μετατρέπεται πίσω σε πυροσταφυλικό, συμβάλλοντας στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης [296]. Αυξημένα επίπεδα αλανίνης έχουν βρεθεί να συνδέονται με την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2 [258,297]. Οι ασθενείς με NAFLD παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα αυτού του

αμινοξέος, γεγονός που συμφωνεί με ευρήματα προηγούμενων μελετών [254,255]. Αν και διαταραχές στις αντιδράσεις των τρανσαμινασών στο ήπαρ, ο μυϊκός καταβολισμός ή η υπερδραστηριότητα της γλυκονεογένεσης, μπορεί να ευθύνονται για την αύξηση των επιπέδων αλανίνης, ο υποκείμενος μηχανισμός δεν έχει τεκμηριωθεί. Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν η αύξηση της αλανίνης, αποτελεί παράγοντα που συμβάλλει στην ανάπτυξη αντίστασης στη γλυκόζη στην περίπτωση της παχυσαρκίας [258].

Τα μειωμένα επίπεδα γλουταμίνης που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με NAFLD υποδηλώνουν επίσης διαταραχές στον μεταβολισμό των αμινοξέων. Η γλουταμίνη, όπως και η αλανίνη, λειτουργεί ως πρόδρομο για τη γλυκονεογένεση και εμπλέκεται στον μεταβολισμό του αζώτου. Αν και προηγούμενες έρευνες σε ασθενείς με NAFLD δεν έχουν αναφέρει αλλαγές στα επίπεδα γλουταμίνης, ωστόσο μειωμένα επίπεδα έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με διαβήτη [280]. Επιπλέον, σε μελέτες μεταβολικού προφίλ δειγμάτων ήπατος σε ασθενείς με στεάτωση έχουν διαπιστωθεί αλλαγές στις συγκεντρώσεις γλουταμίνης [193]. Οι μεταβολικές διεργασίες που ευθύνονται για αυτά τα ευρήματα δεν είναι πλήρως κατανοητές, ωστόσο, η μειωμένη σύνθεση γλουταμίνης, η διαταραχή μεταφοράς αμινοξέων ή η κατανάλωσή της κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες θα μπορούσαν να εξηγήσουν την έλλειψή της.

8.2 Ανάλυση του λιπιδικού προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών

Η ανάλυση της λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών στους ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος ανέδειξε σημαντικές διαφορές, σε σύγκριση με του υγιείς και τους ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν οφείλονται κυρίως στις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στη σύσταση των φωσφολιπιδίων και των λιπαρών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, οι HDL των ασθενών με λιπώδες ήπαρ σε σύγκριση με αυτές της ομάδας ελέγχου παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλινωσιτόλης και αυξημένα ποσοστά σφιγγολιπιδίων, που οφείλονται κυρίως στην αύξηση των κεραμιδίων. Επιπλέον, το ποσοστό των ακόρεστων, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως και το μήκος αλυσού των λιπαρών οξέων είναι μειωμένα στους ασθενείς με λιπώδες ήπαρ σε σχέση με τους υγιείς.

Τα δεδομένα για τη λιπιδική σύσταση των HDL σε ασθενείς με NAFLD είναι περιορισμένα, και μόλις πρόσφατα μία μελέτη διερεύνησε τις αλλαγές που παρατηρούνται στην περίπτωση της NAFL και NASH [298]. Η μείωση της φωσφατιδυλοχολίνης και η αύξηση των κεραμιδίων στα σωματίδια, που παρατηρήθηκε στην ανάλυση μας, συμφωνεί με τα ευρήματα της προηγούμενης μελέτης. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα αποτελέσματά μας στην μελέτη των

Mocciaro et al. δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα της LPC, PE ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της σφίγγομυελίνης.

Οι αλλαγές στη φωσφολιπιδική σύσταση των HDL που αναγνωρίστηκαν στην παρούσα μελέτη, δηλαδή αύξηση της LPC και μείωση της PC, PE, PI συσχετίζονται με τα ευρήματα από μελέτες λιπιδικού προφίλ που διεξήχθησαν σε δείγματα ήπατος από ασθενείς με NAFLD [173,174,299]. Μία πιθανή εξήγηση για αυτές τις ομοιότητες είναι ότι το ήπαρ, ως κύριο όργανο της σύνθεσης και μεταβολισμού των HDL, επηρεάζει άμεσα τη φωσφολιπιδική σύσταση των HDL [300]. Το ήπαρ συνεισφέρει περίπου 70% της συνολικής Apo-A1 των HDL λιποπρωτεϊνών [301]. Η apo-A1, μετά τη σύνθεσή της από το ήπαρ, συνδέεται γρήγορα με φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, μέσω της ATP-binding cassette του ήπατος, για να δημιουργήσει τα δισκοειδή σωματίδια HDL [302]. Μάλιστα, η ηπατική ABCA1 είναι κρίσιμη για τον σχηματισμό των πρόδρομων HDL και το ήπαρ συνεισφέρει την πλειονότητα των φωσφολιπιδίων στα HDL σωματίδια [303]. Επομένως, οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην παρούσα ανάλυση και αφορούσαν τη φωσφολιπιδική σύσταση των λιποπρωτεϊνών HDL σε ασθενείς με NAFLD μπορεί να αποδοθούν εν μέρει στη διαφορετική περιεκτικότητα φωσφολιπιδίων στο ηπατικό παρέγχυμα αυτών των ασθενών.

Η μείωση των φωσφολιπιδίων στο ηπατικό παρέγχυμα των ατόμων με NAFLD αποδίδεται στις διαταραχές μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακριάς αλύσου (LCFA) αποτελούν υποστρώματα για τη σύνθεση εικοσανοειδών και φωσφολιπιδίων. Ωστόσο, στην NAFLD και η δραστηριότητα της FADS1, ενζύμου απαραίτητου για την παραγωγή LCFA έχει βρεθεί μειωμένη με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή αυτών άρα και των φωσφολιπιδίων [173].

Η φωσφατιδυλοχολίνη φαίνεται πως κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην παθοφυσιολογία της NAFLD και είναι το μόνο γνωστό φωσφολιπίδιο που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό και την έκκριση λιποπρωτεϊνών [304]. Η διαταραχή στην ηπατική βιοσύνθεση της PC μειώνει την έκκριση των VLDL από το ήπαρ και ελαττώνει σημαντικά τα επίπεδα των κυκλοφορούντων VLDL και HDL λιποπρωτεϊνών [305]. Η κύρια οδός απομάκρυνσης των λιπιδίων από το ήπαρ είναι η ηπατική έκκριση των τριγλυκεριδίων, τα οποία ενσωματώνονται στις VLDL λιποπρωτεΐνες. Έτσι, η μειωμένη ηπατική διαθεσιμότητα της PC, οδηγεί σε αδυναμία απομάκρυνσης της περίσσειας λιπιδίων και τελικά στη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ [306]. Επιπλέον, η μειωμένη ηπατική PC οδηγεί στο σχηματισμό πρόδρομων VLDL με χαμηλή περιεκτικότητα σε PC, τα οποία υφίστανται γρήγορη κάθαρση από την κυκλοφορία [305]. Πέρα από τη δράση της PC στις λιποπρωτεΐνες, η χαμηλή ηπατική συγκέντρωση σε PC έχει αναφερθεί πως συνεισφέρει στην ηπατική συσσώρευση των τριγλυκεριδίων μέσω ενεργοποίησης του SREBPs μονοπατιού της λιπογένεσης [186].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η μειωμένη PC στις HDL που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με NAFLD, μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της PC στα ηπατοκύτταρα. Ωστόσο, οι κυκλοφορούντες HDL λιποπρωτεΐνες υφίστανται την επίδραση διαφόρων ενζύμων που αλλάζουν τη σύστασή τους και πιθανώς άλλοι άγνωστοι μηχανισμοί μπορεί να συμβάλουν στη μείωση της περιεκτικότητας PC [307]. Για παράδειγμα, το ένζυμο PTLIP είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των φωσφολιπιδίων από τις λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε τριγλυκερίδια στις HDL και παράλληλα συνδράμει στην ωρίμανση των σωματιδίων HDL [308]. Αν και η δραστηριότητα του PTLIP έχει παρατηρηθεί πως ενισχύεται σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από HDL πλούσιες σε TG, τα αποτελέσματα σε μελέτες που διεξήχθησαν σε ασθενείς με NAFLD είναι αντικρουόμενα [198,309,310]. Επιπλέον, η μείωση της PC στις VLDL λόγω της παρεμποδισμένης βιοσύνθεσης PC στο ήπαρ μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη διαθεσιμότητα αυτού του φωσφολιπιδίου για μεταφορά από το PTLIP στα HDL. Από την άλλη πλευρά, δεδομένου ότι το μισό της ηπατικής PC προέρχεται από τις HDL λιποπρωτεΐνες, η μειωμένη περιεκτικότητα των HDL σε PC μπορεί επίσης να εξηγήσει τη χαμηλή ηπατική συγκέντρωση PC που παρατηρείται στους ασθενείς με NAFLD [311]. Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η PC των HDL συμμετέχει ενεργά στην παθογένεση της NAFLD και αποτελεί έναν υποσχόμενο στόχο για περαιτέρω μελέτες, που στοχεύουν στη διερεύνηση των μεταβολικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην πρόοδο της NAFLD.

Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη είναι ένα βιοδραστικό μόριο. Αντιπροσωπεύει ένα ποσοτικά σημαντικό είδος των φωσφολιπιδίων στις HDL και αντιστοιχεί στο έως και 15% του συνολικής λιπιδικής μάζας των HDL [158]. Βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα σε LPC στα σωματίδια HDL των ασθενών με NAFLD αυξήθηκε σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, εύρημα ωστόσο που δεν συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη [298]. Η LPC που εντοπίζεται στις HDL προέρχεται κυρίως από τη δράση της LCAT στην PC. Η υδρόλυση της PC από την λιποπρωτεΐνη-φωσφολιπάση A2, μαζί με την ηπατική έκκριση LPC, θεωρούνται επίσης υπεύθυνες για τα συνολικά επίπεδα LPC στο πλάσμα [312]. Οι μελέτες λιπιδικής σύστασης στο πλάσμα που αφορούν την LPC παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα [313]. Από αναλύσεις βιοψιών ήπατος από ασθενείς με NASH, όμως, διαπιστώθηκε αύξηση της LPC [173,174]. Μάλιστα, αυτή η αύξηση συσχετιζόταν με τη σοβαρότητα της νόσου, υποδηλώνοντας ότι η LPC εμπλέκεται στη λιποτοξικότητα και τη μετάβαση από την απλή στεάτωση στη NASH. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε LPC που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στην αυξημένη ηπατική έκκριση είτε στην ενισχυμένη δραστηριότητα της LCAT και της LpPLA2. Στην NAFLD, οι δραστηριότητες αυτών των δύο ενζύμων βρέθηκαν αυξημένες, αλλά αυτά τα ευρήματα δεν έχουν επαληθευθεί από άλλες μελέτες [314,315].

Στους ασθενείς με NAFLD, τα συνολικά σφιγγολιπίδια αυξήθηκαν κυρίως λόγω της αύξησης των κεραμιδίων, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα κεραμίδια είναι μία

υποκατηγορία βιο-ενεργών λιπιδίων που μόνο ένα μικρό μέρος της συνολικής λιπιδικής μάζας των HDL, και μέχρι στιγμής από μελέτες στη σύνθεση των λιπιδίων των HDL δεν έχουν αναφερθεί στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο περιεχόμενο των κεραμιδίων. Ωστόσο, φαίνεται ότι τα κεραμίδια παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία που χαρακτηρίζει την ανάπτυξη και την πρόοδο της NAFLD [316]. Επιπλέον, αναλύσεις λιπιδικής σύστασης έδειξαν ότι τα κεραμίδια είναι σημαντικά αυξημένα όχι μόνο στα ηπατοκύτταρα ασθενών με λιπώδες ήπαρ αλλά και στο πλάσμα ασθενών με μεταβολικό σύνδρομο [12,317]. Επομένως, η αύξηση του περιεχομένου των κεραμιδίων στις HDL που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με NAFLD πιθανότατα αντικατοπτρίζει την αυξημένη βιοσύνθεση των κεραμιδίων σε έδαφος της χρόνιας φλεγμονής [318]. Αυτό επιβεβαιώνεται από την αύξηση των διυδροκεραμιδίων που έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες και τα οποία αποτελούν δείκτες της *de novo* σύνθεσής τους [319]. Επιπλέον, τα ίδια τα κεραμίδια, μέσω μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης, προάγουν την έκκριση κυτταροκινών και εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες, προκαλώντας δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και κυτταρική απόπτωση [318].

Από τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης ήταν οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στη σύσταση των λιπαρών οξέων των HDL. Τα σωματίδια HDL των ασθενών με NAFLD είχαν μειωμένη περιεκτικότητα σε ακόρεστα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και συγκεκριμένα λινελαϊκό, αραχιδονικό, εικοσαπενταενοϊκό και εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτά τα ευρήματα είναι συμβατά και με τις παρατηρήσεις μελετών σε δείγματα ήπατος και πλάσματος ασθενών με NAFLD [174,313,320]. Η αυξημένη *de novo* λιπογένεση που χαρακτηρίζει την NAFLD καθώς και η δίαιτα πλούσια σε αυτά τα λιπαρά οξέα είναι πιθανά οι κύριοι λόγοι αύξησής τους στον ορό και στο ήπαρ των ασθενών με λιπώδες ήπαρ [231]. Ακόμη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα κορεσμένα λιπαρά οξέα, εύρημα που επίσης συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες στο ήπαρ και ορό των ασθενών με NAFLD [174,229,321]. Η αύξηση των SFA αντικατοπτρίζει την αυξημένη *de novo* λιπογένεση που χαρακτηρίζει την NAFLD, ενώ και η δίαιτα πλούσια σε αυτά μπορεί να είναι υπεύθυνη για τα ευρήματα [231]. Σε ό,τι αφορά την μείωση των PUFA, αν και η *de novo* λιπογένεση και η μειωμένη διαιτητική πρόσληψη μπορεί να είναι αιτία για τα ευρήματά μας, έχει φανεί πως στη NAFLD παρατηρείται σημαντική διαταραχή στα βιοσυνθετικά μονοπάτια αυτών των λιπαρών οξέων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι δραστηριότητες της δεσатуράσης λιπαρών οξέων 1 (FADS1) και της ELOVL6, σημαντικών ενζύμων βιοσύνθεσης είναι μειωμένες σε ασθενείς με NASH και μάλιστα ο ρόλος τους στην πρόοδο απλής στεάτωσης σε NASH είναι αντικείμενο εντατικής μελέτης. [14][229].

Η σύγκριση της λιπιδικής σύστασης της HDL των ασθενών με NAFLD με αυτή των ατόμων με CHD ανέδειξε σημαντικές διαφορές στη σύσταση των εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, συνολικών γλυκεροφωσfolιπιδίων, φωσφατιδυλινωσιτόλης, αιθερικών

γλυκερολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων. Ο εμπλουτισμός των HDL λιποπρωτεϊνών με τριγλυκερίδια και η μείωση των εστέρων χοληστερόλης είναι η πιο κοινή ανωμαλία που παρατηρείται στη λιπιδική σύσταση των HDL και έχει αναγνωριστεί από πλήθος μελετών σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο [164,322]. Επηρεάζει τη δομή των σωματιδίων, οδηγώντας σε αυξημένη απομάκρυνση από την κυκλοφορία αλλά επιδρά και αρνητικά στην αντίστροφη μεταφοράς χοληστερόλης [323–325]. Στην παρούσα μελέτη η παραπάνω διαταραχή δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς με λιπώδες ήπαρ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου αλλά μόνο στην ομάδα των ασθενών με CHD. Οι HDL πλούσιες σε τριγλυκερίδια και με μειωμένη περιεκτικότητα CE έχει αναφερθεί πως είναι αναποτελεσματικοί δότες των εστέρων χοληστερόλης στα κύτταρα μέσω του SR-B1, επιδρώντας με αυτό τον τρόπο στην βασική λειτουργία των σωματιδίων [326,327].

Σε ό,τι αφορά τα γλυκεροφωσfolιπίδια, η PC βρέθηκε ελαττωμένη στους ασθενείς με NAFLD αλλά όχι στην ομάδα των ασθενών με CHD. Η ικανότητα αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης που μεσολαβείται από τον SR-B1 επηρεάζεται δραστικά από τη φωσfolιπιδική σύσταση, και ιδιαίτερα από την περιεκτικότητα σε PC και SM [168]. Οι Yancey κ.ά. έχουν δείξει ότι ο εμπλουτισμός των HDL σε PC αυξάνει την ικανότητα του σωματιδίου να απομακρύνει τη χοληστερόλη από τους περιφερικούς ιστούς [168]. Συνεπώς, η μείωση της PC που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με NAFLD θα μπορούσε να μειώσει ή και ακόμη και να αναστείλει την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Επιπλέον, η PC αναστέλλει την έκφραση των ενδοθηλιακών προ-φλεγμονώδων μορίων και με αυτό τον τρόπο συμβάλλει ενεργά στις αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες των HDL [328]. Άρα, η μείωση της περιεκτικότητας σε PC μπορεί να επηρεάσει αρνητικά με ποικίλους τρόπους τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των HDL. Στην παρούσα ανάλυση, ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα ήταν η μείωση της περιεκτικότητας φωσφατιδυλινοσιτόλης στους ασθενείς με NAFLD, η οποία όμως βρέθηκε αυξημένη στα σωματίδια HDL των ασθενών με CHD. Η PI είναι ένα αρνητικά φορτισμένο φωσfolιπίδιο με σπουδαία σημασία. Ο υποδοχέας SR-B1 έχει φανεί πως παρουσιάζει αυξημένη πρόσδεση σε αρνητικά φορτισμένα σωματίδια, όπως τα σωματίδια πλούσια σε PI [329][330]. Επομένως, η μείωση της περιεκτικότητας σε PI που παρατηρήθηκε στη NAFLD μπορεί να αναστείλει περαιτέρω την απομάκρυνση της χοληστερόλης από την περιφέρεια μέσω του SR-B1[330].

Η σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας σε LPC και της λειτουργικότητας των HDL παραμένει ακόμη ασαφής [331]. Αύξηση της παρατηρήθηκε και στην ομάδα της NAFLD αλλά και στην ομάδα των ασθενών με CHD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Μέχρι και σήμερα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί αν η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης αυξάνεται ή μειώνεται από τον εμπλουτισμό των σωματιδίων με LPC. Ωστόσο, μελέτες σε ασθενείς με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο καθώς και μελέτες σε ασθενείς με διαβήτη ή με οξύ καρδιαγγειακό

σύμβαμα ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα LPC στα HDL ήταν αυξημένη [250,332,333]. Ενώ έχει προταθεί ότι η υψηλότερη περιεκτικότητα HDL-LPC μπορεί να ενισχύσει την πρόσληψη χοληστερόλης, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα HDL εμπλουτισμένα σε LPC συσχετίζονται με παρεμπόδιση της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης και υποβάθμιση των λειτουργιών των HDL [333,334].

Μία αξιοσημείωτη διαφορά στη σύγκριση ασθενών με λιπώδες ήπαρ και καρδιαγγειακή νόσο ήταν οι διαφορές τόσο στα σφιγγολιπίδια όσο και στις επιμέρους κατηγορίες αυτών. Ανάμεσα στις κατηγορίες των σφιγγολιπιδίων, η σφιγγομυελίνη είναι η πιο άφθονη στις λιποπρωτεΐνες HDL και θεωρείται ότι επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργικότητα των HDL σωματιδίων. [158,335]. Αν και στους καρδιαγγειακούς ασθενείς μειώθηκε, παρόμοια μεταβολή δεν παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με NAFLD. Ο εμπλουτισμός των σωματιδίων σε σφιγγομυελίνη αναστέλλει την κάθαρση της χοληστερόλης που εξαρτάται από τους SR-B1 και εμποδίζει την πρόσδεση της LCAT, με αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης της LCAT και μειωμένη αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης [168,335]. Από την άλλη μεριά, έχει αναφερθεί ότι οι εμπλουτισμένες με σφιγγομυελίνη HDL έχουν υψηλότερη αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν την έκφραση των προσκολλητικών μορίων [328]. Επιπλέον, η περιεκτικότητα της HDL σε σφιγγομυελίνη έχει βρεθεί μειωμένη τόσο σε ασθενείς με CHD όσο και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, ενώ αύξηση έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με υπέρταση [250,322,332]. Συνεπώς, αυτές οι παρατηρήσεις καθιστούν απαραίτητες νέες μελέτες που θα εξετάσουν τη σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας της HDL σε σφιγγομυελίνη και των αθηροπροστατευτικών λειτουργιών της HDL. Πιθανά, η αναλογία σφιγγομυελίνης/φωσφατιδυλχολίνης (SM/PC) παίζει ρόλο στη λειτουργικότητα της HDL παρά αυτή καθ' αυτή περιεκτικότητα της σφιγγομυελίνης στα σωματίδια της HDL. Αυτός ο λόγος βρέθηκε αυξημένος στους ασθενείς με λιπώδες ήπαρ και μειωμένος στους ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Όσον αφορά το περιεχόμενο των κεραμιδίων, λίγα πράγματα είναι γνωστά σχετικά με το ρόλο τους στις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες των λιποπρωτεϊνών HDL. Παρατηρήθηκε αύξηση και στις δύο υπό μελέτη ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ωστόσο αυτή αύξηση ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα ασθενών με NAFLD.

Η μελέτη του προφίλ των λιπαρών οξέων στις υπό εξέταση ομάδες ανέδειξε πως οι μεταβολές που παρατηρούνται στους ασθενείς με λιπώδες ήπαρ ακολουθούν τις μεταβολές που παρουσιάζουν τα σωματίδια HDL των ασθενών με CHD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, με αυτές να είναι εντονότερες στους καρδιαγγειακούς ασθενείς. Συγκεκριμένα, ο ρόλος των SFA τους καρδιαγγειακή νόσο έχει πλήρως τεκμηριωθεί τα τελευταία χρόνια και μάλιστα συσχετίζονται με μειωμένη ενδοθηλιακή λειτουργικότητα [164,322]. Συγκεκριμένα, τα SFA προάγουν προφλεγμονώδεις διεργασίες και προκαλούν βλάβη στο ενδοθήλιο εμποδίζοντας την

επιδιόρθωσή του. Τέλος, πλήθος κλινικών μελετών έχει δείξει ότι η κατανάλωση των SFA επηρεάζει αρνητικά τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των HDL, ενώ η κατανάλωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων βελτιώνει σημαντικά τη λειτουργία του ενδοθηλίου [336]. Το ποσοστό των πολυακόρεστων μειώθηκε στο σωματίδια της HDL των ασθενών με NAFLD, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και μείωση παρατηρήθηκε και στην ομάδα των CHD που ήταν μεγαλύτερη. Ειδικότερα, το εικοσαπενταενοϊκό και το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ έχουν ευεργετικά αποτελέσματα για τη λειτουργικότητα των HDL και έχει φανεί πως μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο [90]. Οι μεταβολές στο προφίλ των λιπαρών οξέων των ασθενών με NAFLD ουσιαστικά παρουσιάζουν την ίδια τάση με αυτή των CHD ασθενών και η NAFLD θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως πρόδρομη κατάσταση της CHD, όπου υπάρχουν οι ίδιες μεταβολές σε μικρότερο βαθμό όμως από την καρδιαγγειακή νόσο.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε σημαντικές διαφορές στον μεταβολισμό των διακλαδισμένων αμινοξέων (BCAAs), στη δραστηριότητα του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA), στη λειτουργία του κύκλου της ουρίας, στις διεργασίες που εμπλέκονται στη γλυκόλυση, στη σύνθεση κετονικών σωμάτων, στον μεταβολισμό των αρωματικών αμινοξέων και σε άλλες οδούς που σχετίζονται με τα αμινοξέα σε ασθενείς με NAFLD. Τα ευρήματα δείχνουν τον πολύπλοκο τρόπο με τον οποίο οι μεταβολικές οδοί αλληλεπιδρούν για να ρυθμίσουν τα επίπεδα των αμινοξέων και την ενεργειακή ισορροπία στην περίπτωση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. Επίσης, τονίζουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για αυτές τις αλλαγές με στόχο την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου.

Ακόμη, ανέδειξε ότι η σύσταση των λιπιδίων των HDL, και ιδιαίτερα το προφίλ των φωσφολιπιδίων και αυτών των λιπαρών οξέων, είναι διαφορετική σε ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτές οι αλλαγές ακολουθούν τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στα ηπατοκύτταρα των ασθενών με NAFLD και πιθανόν αντικατοπτρίζουν τις διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων που συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της NAFLD. Επομένως, το διαφορετικό λιπιδικό προφίλ των HDL μπορεί να λειτουργήσει ως δυνητικός δείκτης προόδου της νόσου. Ακόμη, δεδομένου ότι η λιπιδική σύσταση των HDL επηρεάζει σημαντικά τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες των HDL, οι αλλαγές που παρατηρήσαμε φαίνεται να επηρεάζουν αρνητικά την αντιαθηρογόνο λειτουργία των HDL και μπορεί να εξηγήσουν εν μέρει τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο των ασθενών με NAFLD.

10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι μία από τις πιο συχνές αιτίες χρόνιας ηπατικής νόσου και εξελίσσεται σε μείζον πρόβλημα υγείας παγκοσμίως. Εκτός από τις επιπλοκές της χρόνιας ηπατοπάθειας, ο αυξημένος καρδιαγγειακός κίνδυνος αποτελεί βασική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στους ασθενείς με NAFLD. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση συνολικού μεταβολικού προφίλ και του λιπιδικού προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με NAFLD, με στόχο την αναγνώριση των μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την πάθηση και την εξήγηση του αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου που παρουσιάζουν οι εν λόγω ασθενείς.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήθηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ το μεταβολικό προφίλ 62 ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο ήπατος (υπερηχογραφικά επιβεβαιωμένη) και 43 υγιών εθελοντών. Ακολούθησε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ μελέτη της λιπιδιακής σύστασης των HDL σωματιδίων 51 ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο ήπατος, 40 ασθενών με εγκατεστημένη Καρδιαγγειακή Νόσο και 50 υγιών εθελοντών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους 53 μεταβολίτες που μετρήθηκαν, 37 παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στους ασθενείς με NAFLD. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ισολευκίνης, βαλίνης, 2-οξοϊσοκαπροϊκού και 3-υδροξυϊσοβουτυρικού ήταν αυξημένα. Οι ασθενείς με NAFLD εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταβολιτών της κετογένεσης και κετόλυσης όπως οξικό, ακετοξικό, 2-υδροξυβουτυρικό και 3-υδροξυβουτυρικό. Επίσης, το γαλακτικό και το πυροσταφυλικό, που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας, ήταν αυξημένα στην ομάδα της NAFLD.

Αυξημένοι στην ομάδα της NAFLD ήταν επίσης μεταβολίτες που σχετίζονται με τον κύκλο του ενεργοποιημένου μεθυλίου (βεταΐνη, διμεθυλαμίνη, φορμικό, μεθειονίνη, γλυκίνη, χολίνη, σαρκίνη), τον μεταβολισμό των πουρινών (υποξανθίνη) και αμινοξέων όπως η αλανίνη, ασπαρτικό, γλυκίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη. Άλλοι μεταβολίτες όπως η καρνιτίνη, Ο-ακετυλοκαρνιτίνη, κρεατίνη, N,N-διμεθυλογλυκίνη, μυο-ινοσιτόλη βρέθηκαν επίσης αυξημένοι σε ασθενείς με NAFLD σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, οι ασθενείς με NAFLD είχαν χαμηλότερα επίπεδα των αμινοξέων αργινίνη, γλουταμίνη και σερίνη, καθώς και άλλων μεταβολιτών όπως η ορνιθίνη, ακετόνη και ταυρίνη.

Στο κλάσμα της HDL των ασθενών με NAFLD παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της περιεκτικότητας σε φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλινωσιτόλη, σε σύγκριση με τους υγιείς, και αύξηση της ελεύθερης χοληστερόλης, της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, άλλων αιθερικών λιπιδίων και των συνολικών σφιγγολιπιδίων. Η αύξηση των σφιγγολιπιδίων οφείλεται κυρίως στον εμπλουτισμό της HDL με κεραμίδια και άλλα σφιγγολιπίδια. Επιπλέον, ο λόγος φωσφατιδυλοχολίνης προς σφιγγομυελίνη ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με NAFLD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στους ασθενείς με NAFLD, παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα σε κορεσμένα και μειωμένη σε ακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, η % περιεκτικότητα του σωματιδίου σε λινελαϊκό οξύ, σε εικοσιπεντανοϊκό οξύ, αραχιδονικό οξύ και εικοσιδιεξανοϊκό οξύ ήταν σε χαμηλότερα ποσοστά στους ασθενείς με NAFLD σε σχέση με τους υγιείς και το μέσο μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων ήταν μικρότερο. Αντίθετα, οι λόγοι κορεσμένα/ακόρεστα καθώς και κορεσμένα/πολυακόρεστα ήταν μεγαλύτεροι στην ομάδα της NAFLD εν συγκρίσει με την ομάδα ελέγχου. Σε σχέση με την HDL των ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο, η HDL των ατόμων με NAFLD παρουσίαζε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών γλυκεροφωσfolιπιδίων και συγκεκριμένα φωσφατιδυλινωσιτόλης. 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 όσο και στα κεραμίδια. Οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν παρόμοιες μεταβολές με τους CHD σε σχέση με τους υγιείς όσον αφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων. Η περιεκτικότητα του σωματιδίου της HDL των ασθενών με CHD σε κορεσμένα αυξήθηκε, ενώ σε ακόρεστα, πολυακόρεστα και ειδικά στο λινελαϊκό εικοσιπεντανοϊκό οξύ, αραχιδονικό οξύ και εικοσιδιεξανοϊκό οξύ μειώθηκε σε σύγκριση με τους ασθενείς με NAFLD. Επιπλέον, το μέσο μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων ήταν μικρότερο στην ομάδα ασθενών με CHD εν συγκρίσει με την ομάδα της NAFLD ενώ οι λόγοι κορεσμένα/ακόρεστα καθώς και κορεσμένα/πολυακόρεστα ήταν μεγαλύτεροι.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στον μεταβολισμό αμινοξέων και λιπιδίων σε ασθενείς με NAFLD. Διαπιστώθηκαν αλλαγές στο μεταβολισμό των BCAAs, στη δραστηριότητα του κύκλου του κιτρικού οξέος, στη γλυκόλυση, στη σύνθεση κετονικών σωμάτων και στον μεταβολισμό των αρωματικών αμινοξέων. Επίσης, η σύσταση των λιπιδίων των HDL, ειδικά των φωσfolιπιδίων και των λιπαρών οξέων, ήταν διαφορετική σε σχέση με υγιείς. Αυτές οι αλλαγές ακολουθούν τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στα ηπατοκύτταρα των ασθενών με NAFLD και μπορεί να λειτουργήσουν ως δείκτες προόδου της νόσου αλλά και να εξηγήσουν τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο αυτών των ασθενών.

11. ABSTRACT

INTRODUCTION:

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common causes of chronic liver disease and is becoming a major global health issue. In addition to the complications of chronic liver disease, increased cardiovascular risk is a primary cause of morbidity and mortality in patients with NAFLD. The aim of the study was to investigate the overall metabolic profile and the lipid profile of HDL lipoproteins in patients with NAFLD to identify the metabolic disorders associated with the condition and to explain the increased cardiovascular risk these patients face.

MATERIALS AND METHODS:

The metabolic profile of 62 patients with non-alcoholic fatty liver disease (confirmed by ultrasound) and 43 healthy volunteers was studied using ^1H -NMR spectroscopy. ^1H -NMR spectroscopy was also used to study the lipid composition of HDL particles in 51 patients with NAFLD, 40 patients with established cardiovascular disease, and 50 healthy volunteers.

RESULTS:

Of the 53 metabolites measured, 37 showed significant differences in patients with NAFLD. Specifically, the levels of isoleucine, valine, 2-oxoisocaproic acid, and 3-hydroxyisobutyric acid were elevated. Patients with NAFLD had higher concentrations of metabolites involved in ketogenesis and ketolysis, such as acetic acid, acetoacetic acid, 2-hydroxybutyric acid, and 3-hydroxybutyric acid. Additionally, lactate and pyruvate, which are related to energy production, were elevated in the NAFLD group.

Metabolites related to the activated methyl cycle (betaine, dimethylamine, formic acid, methionine, glycine, choline, sarcosine), purine metabolism (hypoxanthine), and amino acids such as alanine, aspartate, glycine, tryptophan, and tyrosine were also elevated in the NAFLD group. Other metabolites, including carnitine, O-acetylcarnitine, creatine, N,N-dimethylglycine, myo-inositol, kynurenine, and 2-oxoglutarate, were found to be increased in patients with NAFLD compared to the control group. Conversely, patients with NAFLD had lower levels of the amino acids arginine, glutamine, and serine, as well as other metabolites such as ornithine, acetone, and taurine.

In the HDL fraction of patients with NAFLD, there was a significant decrease in the content of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylinositol compared to

healthy individuals, and an increase in free cholesterol, lysophosphatidylcholine, other ether lipids, and total sphingolipids. The increase in sphingolipids was primarily due to the enrichment of HDL particles with ceramides and other sphingolipids. Additionally, the phosphatidylcholine to sphingomyelin ratio was significantly higher in patients with NAFLD compared to the control group.

In patients with NAFLD, there was an increased content of saturated fatty acids and a decrease in unsaturated and polyunsaturated fatty acids. The percentage content of linoleic acid, eicosapentaenoic acid, arachidonic acid, and docosahexaenoic acid in HDL particles was lower in NAFLD patients compared to healthy individuals, and the average fatty acid chain length was shorter. Conversely, the ratios of saturated to unsaturated and saturated to polyunsaturated fatty acids were higher in the NAFLD group compared to the control group. Compared to HDL from patients with cardiovascular disease (CHD), HDL from NAFLD patients had significantly lower total glycerophospholipids, particularly phosphatidylinositol. The total sphingolipid content was notably increased in HDL from NAFLD patients compared to CHD patients, due to both sphingomyelin and ceramides. NAFLD patients showed similar fatty acid profile changes to CHD patients compared to healthy individuals. The HDL particle content of CHD patients had increased saturated fatty acids, while unsaturated, polyunsaturated, and specifically linoleic, eicosapentaenoic, arachidonic, and docosahexaenoic acids were reduced compared to NAFLD patients. Furthermore, the average fatty acid chain length was shorter in the CHD group compared to the NAFLD group, while the ratios of saturated to unsaturated and saturated to polyunsaturated fatty acids were higher.

CONCLUSIONS:

The study revealed significant differences in amino acid and lipid metabolism in patients with NAFLD. There were changes in the metabolism of BCAAs, TCA cycle activity, glycolysis, ketone body synthesis, and aromatic amino acid metabolism. Additionally, the lipid composition of HDL, especially phospholipids and fatty acids, differed compared to healthy individuals. These changes mirror the differences observed in the hepatocytes of NAFLD patients and may serve as markers for disease progression and explain the increased cardiovascular risk in these patients.

Βιβλιογραφία

- [1] Brunt EM, Wong VW-S, Nobili V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primer* 2015;1:15080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.80>.
- [2] Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>.
- [3] De A, Duseja A. Natural History of Simple Steatosis or Nonalcoholic Fatty Liver. *J Clin Exp Hepatol* 2020;10:255–62. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2019.09.005>.
- [4] Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol* 2012;56:1384–91. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.027>.
- [5] Zezos P, Renner EL. Liver transplantation and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:15532–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15532>.
- [6] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- [7] Targher G, Byrne CD, Lonardo A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol* 2016;65:589–600. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.013>.
- [8] Lonardo A, Sookoian S, Pirola CJ, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism* 2016;65:1136–50. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.09.017>.
- [9] Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, et al. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology* 2005;129:113–21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.04.014>.
- [10] Kim D, Kim WR, Kim HJ, et al. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology* 2013;57:1357–65. <https://doi.org/10.1002/hep.26156>.
- [11] Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol* 2023;79:1542–56. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.06.003>.
- [12] Meikle PJ, Summers SA. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:79–91. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.169>.
- [13] Schuster S, Cabrera D, Arrese M, et al. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:349–64. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0009-6>.
- [14] Musso G, Cassader M, Paschetta E, et al. Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2018;155:282–302.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.031>.
- [15] Gitto S, Schepis F, Andreone P, et al. Study of the Serum Metabolomic Profile in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Research and Clinical Perspectives. *Metabolites* 2018;8:17. <https://doi.org/10.3390/metabo8010017>.
- [16] Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J Hepatol* 2019;70:531–44. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.033>.
- [17] Riazzi K, Azhari H, Charette JH, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2022;7:851–61. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00165-0).
- [18] Le MH, Yeo YH, Li X, et al. 2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2022;20:2809–2817.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.12.002>.
- [19] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia* 2016;59:1121–40. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3902-y>.
- [20] Lee K-C, Wu P-S, Lin H-C. Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis. *Clin Mol Hepatol* 2022. <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0237>.

- [21] Caussy C, Reeder SB, Sirlin CB, et al. Noninvasive, Quantitative Assessment of Liver Fat by MRI-PDFF as an Endpoint in NASH Trials. *Hepatology* 2018;68:763–72. <https://doi.org/10.1002/hep.29797>.
- [22] Le MH, Le DM, Baez TC, et al. Global incidence of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of 63 studies and 1,201,807 persons. *J Hepatol* 2023;S0168-8278(23)00219-2. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.040>.
- [23] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-6-33>.
- [24] Lee J-H, Kim D, Kim HJ, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver* 2010;42:503–8. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.08.002>.
- [25] Le MH, Yeo YH, Li X, et al. 2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 2022;20:2809-2817.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.12.002>.
- [26] Li J, Zou B, Yeo YH, et al. Prevalence, incidence, and outcome of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, 1999-2019: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4:389–98. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30039-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30039-1).
- [27] Cholongitas E, Pavlopoulou I, Papatheodoridi M, et al. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Ann Gastroenterol* 2021;34:404–14. <https://doi.org/10.20524/aog.2021.0604>.
- [28] Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413–9. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70506-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70506-8).
- [29] Lazarus JV, Mark HE, Anstee QM, et al. Advancing the global public health agenda for NAFLD: a consensus statement. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2022;19:60–78. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00523-4>.
- [30] Sepanlou SG, Safiri S, Bisignano C, et al. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020;5:245–66. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30349-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30349-8).
- [31] Anderson EL, Howe LD, Jones HE, et al. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* 2015;10:e0140908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140908>.
- [32] Xin Zhang, Mingshan Wu, Zhenqiu Liu, et al. Increasing prevalence of NAFLD/NASH among children, adolescents and young adults from 1990 to 2017: a population-based observational study. *BMJ Open* 2021;11:e042843. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-042843>.
- [33] Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMra011775>.
- [34] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- [35] Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013;58:593–608. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.005>.
- [36] Huang H-L, Lin W-Y, Lee L-T, et al. Metabolic syndrome is related to nonalcoholic steatohepatitis in severely obese subjects. *Obes Surg* 2007;17:1457–63. <https://doi.org/10.1007/s11695-008-9423-0>.
- [37] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol* 2017;42:92–108. <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.16.02563-3>.
- [38] Boutari C, Perakakis N, Mantzoros CS. Association of Adipokines with Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinol Metab Seoul Korea* 2018;33:33–43. <https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.1.33>.
- [39] Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)* 2012;91:319–27. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3182779d49>.
- [40] Kim D, Kim WR. Nonobese Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 2017;15:474–85. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.08.028>.

- [41] Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>.
- [42] Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 2015;62:S47–64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>.
- [43] Kanwar P, Kowdley KV. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2016;20:225–43. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.002>.
- [44] Katsiki N, Perez-Martinez P, Anagnostis P, et al. Is Nonalcoholic Fatty Liver Disease Indeed the Hepatic Manifestation of Metabolic Syndrome? *Curr Vasc Pharmacol* 2018;16:219–27. <https://doi.org/10.2174/1570161115666170621075619>.
- [45] Zhang T, Zhang C, Zhang Y, et al. Metabolic syndrome and its components as predictors of nonalcoholic fatty liver disease in a northern urban Han Chinese population: a prospective cohort study. *Atherosclerosis* 2015;240:144–8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.049>.
- [46] Wainwright P, Byrne CD. Bidirectional Relationships and Disconnects between NAFLD and Features of the Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci* 2016;17:367. <https://doi.org/10.3390/ijms17030367>.
- [47] Allen AM, Therneau TM, Larson JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: A 20 year-community study. *Hepatol Baltim Md* 2018;67:1726–36. <https://doi.org/10.1002/hep.29546>.
- [48] Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2019;71:793–801. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>.
- [49] Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:330–44. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.41>.
- [50] Zoppini G, Fedeli U, Gennaro N, et al. Mortality from chronic liver diseases in diabetes. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1020–5. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.132>.
- [51] Khan RS, Bril F, Cusi K, et al. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatol Baltim Md* 2019;70:711–24. <https://doi.org/10.1002/hep.30429>.
- [52] Fruci B, Giuliano S, Mazza A, et al. Nonalcoholic Fatty Liver: A Possible New Target for Type 2 Diabetes Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci* 2013;14:22933–66. <https://doi.org/10.3390/ijms141122933>.
- [53] Mantovani A, Byrne CD, Bonora E, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Incident Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *Diabetes Care* 2018;41:372–82. <https://doi.org/10.2337/dc17-1902>.
- [54] Mendez-Sanchez N, Cruz-Ramon VC, Ramirez-Perez OL, et al. New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci* 2018;19:2034. <https://doi.org/10.3390/ijms19072034>.
- [55] Singh SP, Singh A, Misra D, et al. Risk Factors Associated With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Indians: A Case–Control Study. *J Clin Exp Hepatol* 2015;5:295–302. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2015.09.001>.
- [56] Ruscica M, Ferri N, Macchi C, et al. Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9. *Ann Med* 2016;48:384–91. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1188328>.
- [57] Kamal S, Khan MA, Seth A, et al. Beneficial Effects of Statins on the Rates of Hepatic Fibrosis, Hepatic Decompensation, and Mortality in Chronic Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2017;112:1495–505. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.170>.
- [58] Kim G, Jang S-Y, Nam CM, et al. Statin use and the risk of hepatocellular carcinoma in patients at high risk: A nationwide nested case-control study. *J Hepatol* 2018;68:476–84. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.018>.
- [59] Duseja A, Chalasani N. Epidemiology and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Hepatol Int* 2013;7 Suppl 2:755–64. <https://doi.org/10.1007/s12072-013-9480-x>.
- [60] Huh Y, Cho YJ, Nam GE. Recent Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Obes Metab Syndr* 2022;31:17–27. <https://doi.org/10.7570/jomes22021>.
- [61] Yang JD, Abdelmalek MF, Pang H, et al. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Baltim Md* 2014;59:1406–14. <https://doi.org/10.1002/hep.26761>.

- [62] Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AMS, et al. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:371–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.019>.
- [63] Mehal WZ. The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:637–44. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.146>.
- [64] Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, et al. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1204–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.010>.
- [65] Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 2014;146:1513–24. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.020>.
- [66] Schoeler M, Ellero-Simatos S, Birkner T, et al. The interplay between dietary fatty acids and gut microbiota influences host metabolism and hepatic steatosis. *Nat Commun* 2023;14:5329. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41074-3>.
- [67] Zhu L, Baker SS, Gill C, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 2013;57:601–9. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>.
- [68] Loomba R, Seguritan V, Li W, et al. Gut microbiome based metagenomic signature for non-invasive detection of advanced fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 2017;25:1054–1062.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.001>.
- [69] Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md* 2010;51:1961–71. <https://doi.org/10.1002/hep.23535>.
- [70] Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009;16.
- [71] Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis* 2015;35:221–35. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562943>.
- [72] Lu W, Li S, Li J, et al. Effects of Omega-3 Fatty Acid in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2016;2016:1459790. <https://doi.org/10.1155/2016/1459790>.
- [73] Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2013;59:138–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.012>.
- [74] Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol* 2017;9:715–32. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i16.715>.
- [75] Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3498–504. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2240>.
- [76] Keating SE, Hackett DA, George J, et al. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2012;57:157–66. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.023>.
- [77] Hamabe A, Uto H, Imamura Y, et al. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. *J Gastroenterol* 2011;46:769–78. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0376-z>.
- [78] Zein CO, Unalp A, Colvin R, et al. Smoking and Severity of Hepatic Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol* 2011;54:753–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.040>.
- [79] Juanola O, Martínez-López S, Francés R, et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:5227. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105227>.
- [80] Dong Yun Kim, Jun Yong Park. Genetic risk factors associated with NAFLD. *Hepatoma Res* 2020;6:85. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2020.96>.
- [81] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461–5. <https://doi.org/10.1038/ng.257>.
- [82] Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md* 2010;51:1209–17. <https://doi.org/10.1002/hep.23622>.
- [83] Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2014;46:352–6. <https://doi.org/10.1038/ng.2901>.
- [84] Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2015;239:192–202. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.001>.

- [85] Nassir F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules* 2022;12:824. <https://doi.org/10.3390/biom12060824>.
- [86] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016;65:1038–48. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.
- [87] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998;114:842–5. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70599-2).
- [88] Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* 2017;8:1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>.
- [89] Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008;28:370–9. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1091981>.
- [90] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343–51. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.
- [91] Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol* 2014;20:1746–55. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i7.1746>.
- [92] Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* 2019;576:51–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1797-8>.
- [93] Pafili K, Roden M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Mol Metab* 2021;50:101122. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101122>.
- [94] Benhamed F, Denechaud P-D, Lemoine M, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012;122:2176–94. <https://doi.org/10.1172/JCI41636>.
- [95] Aggarwal P, Singh T, Alkhouri N. Metabolic Targets in Nonalcoholic Steatohepatitis: Treating the Disease at the Metabolic Root. *Curr Hepatol Rep* 2020;19:302–14. <https://doi.org/10.1007/s11901-020-00533-x>.
- [96] Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005;48:634–42. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1682-x>.
- [97] Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 2003;44:22–32. <https://doi.org/10.1194/jlr.r200014-jlr200>.
- [98] Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008;118:316–32. <https://doi.org/10.1172/JCI32752>.
- [99] Fabbri E, Mohammed BS, Magkos F, et al. Alterations in Adipose Tissue and Hepatic Lipid Kinetics in Obese Men and Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2008;134:424–31. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.038>.
- [100] Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014;15:8713–42. <https://doi.org/10.3390/ijms15058713>.
- [101] Begrich K, Massart J, Robin M-A, et al. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md* 2013;58:1497–507. <https://doi.org/10.1002/hep.26226>.
- [102] Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab* 2015;21:739–46. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.004>.
- [103] Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM Mon J Assoc Physicians* 2010;103:71–83. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcp158>.
- [104] Yang Z-H, Miyahara H, Takeo J, et al. 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;4:32. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-32>.
- [105] Canello R, Tordjman J, Poitou C, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 2006;55:1554–61. <https://doi.org/10.2337/db06-0133>.
- [106] Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatol Baltim Md* 2004;40:46–54. <https://doi.org/10.1002/hep.20280>.
- [107] Duseja A, Chawla YK. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. *Clin Liver Dis* 2014;18:59–71. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.002>.

- [108] Jiang C, Xie C, Li F, et al. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2015;125:386–402. <https://doi.org/10.1172/JCI76738>.
- [109] 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;52:165–74. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.004>.
- [110] Pouwels S, Sakran N, Graham Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocr Disord* 2022;22:63. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-00980-1>.
- [111] Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi 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;48:792–8. <https://doi.org/10.1002/hep.22429>.
- [112] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, 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;67:328–57. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>.
- [113] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *J Hepatology* 2024;81:492–542. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.04.031>.
- [114] Lee SS, Park SH, Kim HJ, et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatology* 2010;52:579–85. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.01.008>.
- [115] Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatology* 2014;28:607–18. <https://doi.org/10.1155/2014/757929>.
- [116] Kechagias S, Ekstedt M, Simonsson C, et al. Non-invasive diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease. *Hormones* 2022;21:349–68. <https://doi.org/10.1007/s42000-022-00377-8>.
- [117] Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, et al. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatology* 2018;15:461–78. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0014-9>.
- [118] Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatology* 2013;10:666–75. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.175>.
- [119] Oliver SG, Winson MK, Kell DB, et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998;16:373–8. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01214-1).
- [120] Nicholson JK, Connolly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:153–61. <https://doi.org/10.1038/nrd728>.
- [121] Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, et al. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature* 2012;491:384–92. <https://doi.org/10.1038/nature11708>.
- [122] Beyoğlu D, Idle JR. The metabolomic window into hepatobiliary disease. *J Hepatology* 2013;59:842–58. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.05.030>.
- [123] Dumas M-E, Kinross J, Nicholson JK. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014;146:46–62. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.001>.
- [124] Masoodi M, Gastaldelli A, Hyötyläinen T, et al. Metabolomics and lipidomics in NAFLD: biomarkers and non-invasive diagnostic tests. *Nat Rev Gastroenterol Hepatology* 2021;18:835–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00502-9>.
- [125] Le Moyec L, Triba M N, Nahon P, et al. Nuclear magnetic resonance metabolomics and human liver diseases: The principles and evidence associated with protein and carbohydrate metabolism (Review). *Biomed Rep* 2017;6:387–95. <https://doi.org/10.3892/br.2017.868>.
- [126] Kalhan SC, Guo L, Edmison J, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2011;60:404–13. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.03.006>.
- [127] Kim HY. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease metabolomics. *Clin Mol Hepatology* 2021;27:553–9. <https://doi.org/10.3350/cmh.2021.0127>.
- [128] Lake AD, Novak P, Shipkova P, et al. Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids* 2015;47:603–15. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1894-9>.
- [129] Kakazu E, Sano A, Morosawa T, et al. Branched chain amino acids are associated with the heterogeneity of the area of lipid droplets in hepatocytes of patients with non-alcoholic fatty

- liver disease. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 2019;49:860–71. <https://doi.org/10.1111/hepr.13346>.
- [130] Kitajima Y, Takahashi H, Akiyama T, et al. Supplementation with branched-chain amino acids ameliorates hypoalbuminemia, prevents sarcopenia, and reduces fat accumulation in the skeletal muscles of patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 2018;53:427–37. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1370-x>.
- [131] Gaggini M, Carli F, Rosso C, et al. Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatol Baltim Md* 2018;67:145–58. <https://doi.org/10.1002/hep.29465>.
- [132] Grzych G, Vonghia L, Bout M-A, et al. Plasma BCAA Changes in Patients With NAFLD Are Sex Dependent. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105:dgaal75. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaal75>.
- [133] Masarone M, Troisi J, Aglitti A, et al. Untargeted metabolomics as a diagnostic tool in NAFLD: discrimination of steatosis, steatohepatitis and cirrhosis. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc* 2021;17:12. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01756-1>.
- [134] Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 2011;17:448–53. <https://doi.org/10.1038/nm.2307>.
- [135] Haufe S, Witt H, Engeli S, et al. Branched-chain and aromatic amino acids, insulin resistance and liver specific ectopic fat storage in overweight to obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2016;26:637–42. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.013>.
- [136] Kawanaka M, Nishino K, Oka T, et al. Tyrosine levels are associated with insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatic Med Evid Res* 2015;7:29–35. <https://doi.org/10.2147/HMER.S79100>.
- [137] Sunny NE, Kalavalapalli S, Bril F, et al. Cross-talk between branched-chain amino acids and hepatic mitochondria is compromised in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015;309:E311–319. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00161.2015>.
- [138] Soga T, Sugimoto M, Honma M, et al. Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol* 2011;55:896–905. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.031>.
- [139] Zhou Y, Orešič M, Leivonen M, et al. Noninvasive Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Clinical Markers and Circulating Levels of Lipids and Metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:1463–1472.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.046>.
- [140] Dasarathy S, Kasumov T, Edmison JM, et al. Glycine and urea kinetics in nonalcoholic steatohepatitis in human: effect of intralipid infusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G567–575. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00042.2009>.
- [141] Kalhan SC, Edmison J, Marczewski S, et al. Methionine and Protein Metabolism in Non Alcoholic Steatohepatitis: Evidence for Lower Rate of Transmethylation of Methionine. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2011;121:179–89. <https://doi.org/10.1042/CS20110060>.
- [142] Pastore A, Alisi A, di Giovamberardino G, et al. Plasma Levels of Homocysteine and Cysteine Increased in Pediatric NAFLD and Strongly Correlated with Severity of Liver Damage. *Int J Mol Sci* 2014;15:21202–14. <https://doi.org/10.3390/ijms151121202>.
- [143] Mardinoglu A, Bjornson E, Zhang C, et al. Personal model-assisted identification of NAD⁺ and glutathione metabolism as intervention target in NAFLD. *Mol Syst Biol* 2017;13:916. <https://doi.org/10.15252/msb.20167422>.
- [144] Kalhan SC, Guo L, Edmison J, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metab - Clin Exp* 2011;60:404–13. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.03.006>.
- [145] Du K, Chitneni SK, Suzuki A, et al. Increased Glutaminolysis Marks Active Scarring in Nonalcoholic Steatohepatitis Progression. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;10:1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.12.006>.
- [146] Sud M, Fahy E, Cotter D, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res* 2007;35:D527–532. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>.
- [147] Oresic M, Hänninen VA, Vidal-Puig A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends Biotechnol* 2008;26:647–52. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.09.001>.
- [148] Sandra K, Sandra P. Lipidomics from an analytical perspective. *Curr Opin Chem Biol* 2013;17:847–53. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.010>.
- [149] 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;44:1071–9. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>.

- [150] 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;47:2101–11. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600022-JLR200>.
- [151] Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:594–610. <https://doi.org/10.1038/nrd1776>.
- [152] Teo CC, Chong WPK, Tan E, et al. Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *TrAC Trends Anal Chem* 2015;66:1–18. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.010>.
- [153] Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 2004;306:471–3. <https://doi.org/10.1126/science.1104404>.
- [154] Von Eckardstein A, Kardassis D, editors. High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation. vol. 224. Cham: Springer International Publishing; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0>.
- [155] De Lalla OF, Gofman JW. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Methods Biochem Anal* 1954;1:459–78. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch16>.
- [156] Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1986;128:417–31. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)28084-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)28084-2).
- [157] Barrans A, Jaspard B, Barbaras R, et al. Pre-beta HDL: structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1996;1300:73–85. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00236-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00236-7).
- [158] Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome1. *J Lipid Res* 2013;54:2950–63. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036095>.
- [159] Boes E, Coassin S, Kollerits B, et al. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: A systematic in-depth review. *Exp Gerontol* 2009;44:136–60. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.11.003>.
- [160] Pérez-Méndez Ó, Pacheco HG, Martínez-Sánchez C, et al. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: Function or structure? *Clin Chim Acta* 2014;429:111–22. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.12.001>.
- [161] Kosmas CE, Christodoulidis G, Cheng J, et al. High-Density Lipoprotein Functionality in Coronary Artery Disease. *Am J Med Sci* 2014;347:504–8. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000231>.
- [162] Sviridov D, Mukhamedova N, T. Remaley A, et al. Antiatherogenic Functionality of High Density Lipoprotein: How Much versus How Gooden-subtitle=. *J Atheroscler Thromb* 2008;15:52–62. <https://doi.org/10.5551/jat.E571>.
- [163] Kon V, Ikizler TA, Fazio S. Importance of high-density lipoprotein quality: evidence from chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013;22.
- [164] Kostara CE, Papathanasiou A, Psychogios N, et al. NMR-Based Lipidomic Analysis of Blood Lipoproteins Differentiates the Progression of Coronary Heart Disease. *J Proteome Res* 2014;13:2585–98. <https://doi.org/10.1021/pr500061n>.
- [165] Morgantini C, Meriwether D, Baldi S, et al. HDL lipid composition is profoundly altered in patients with type 2 diabetes and atherosclerotic vascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD* 2014;24:594–9. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.12.011>.
- [166] Holzer M, Wolf P, Curcic S, et al. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res* 2012;53:1618–24. <https://doi.org/10.1194/jlr.M027367>.
- [167] Fournier N, Paul JL, Atger V, 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;17:2685–91. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.11.2685>.
- [168] Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, 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;275:36596–604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006924200>.
- [169] Ferretti G, Bacchetti T, Nègre-Salvayre A, et al. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 2006;184:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.008>.
- [170] de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis* 2012;222:390–4. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.032>.

- [171] ARAYA J, RODRIGO R, VIDELA LA, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* 2004;106:635–43. <https://doi.org/10.1042/CS20030326>.
- [172] Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. *J Hepatol* 2008;48:300–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.09.009>.
- [173] Chiappini F, Coilly A, Kadar H, et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep* 2017;7:46658–46658. <https://doi.org/10.1038/srep46658>.
- [174] Puri P, Baillie RA, Wiest MM, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081–90. <https://doi.org/10.1002/hep.21763>.
- [175] Ma DWL, Arendt BM, Hillyer LM, et al. Plasma phospholipids and fatty acid composition differ between liver biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease and healthy subjects. *Nutr Diabetes* 2016;6:e220. <https://doi.org/10.1038/ntud.2016.27>.
- [176] Puri P, Wiest MM, Cheung O, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009;50:1827–38. <https://doi.org/10.1002/hep.23229>.
- [177] Tiwari-Heckler S, Gan-Schreier H, Stremmel W, et al. Circulating Phospholipid Patterns in NAFLD Patients Associated with a Combination of Metabolic Risk Factors. *Nutrients* 2018;10:649. <https://doi.org/10.3390/nu10050649>.
- [178] Gordon DL, Myers DS, Ivanova PT, et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J Lipid Res* 2015;56:722–36. <https://doi.org/10.1194/jlr.P056002>.
- [179] Peng K-Y, Watt MJ, Rensen S, et al. Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Lipid Res* 2018;59:1977–86. <https://doi.org/10.1194/jlr.M085613>.
- [180] Vance DE, Vance JE. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S132-137. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800048-JLR200>.
- [181] Sundler R, Akesson B. Regulation of phospholipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. Effect of different substrates. *J Biol Chem* 1975;250:3359–67.
- [182] Arendt BM, Ma DWL, Simons B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic and erythrocyte ratios of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 2013;38:334–40. <https://doi.org/10.1139/apnm-2012-0261>.
- [183] Song J, da Costa KA, Fischer LM, et al. Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2005;19:1266–71. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3580com>.
- [184] Waite KA, Cabilio NR, Vance DE. Choline deficiency-induced liver damage is reversible in Pemt(-/-) mice. *J Nutr* 2002;132:68–71. <https://doi.org/10.1093/jn/132.1.68>.
- [185] Jacobs RL, Zhao Y, Koonen DPY, et al. Impaired de Novo Choline Synthesis Explains Why Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase-deficient Mice Are Protected from Diet-induced Obesity *. *J Biol Chem* 2010;285:22403–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108514>.
- [186] Walker AK, Jacobs RL, Watts JL, et al. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell* 2011;147:840–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.045>.
- [187] Bigay J, Antonny B. Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Dev Cell* 2012;23:886–95. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.009>.
- [188] Li Z, Agellon LB, Allen TM, et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;3:321–31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.007>.
- [189] Anjani K, Lhomme M, Sokolovska N, et al. Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J Hepatol* 2015;62:905–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.002>.
- [190] Balla T. Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol Rev* 2013;93:1019–137. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2012>.
- [191] Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000;405:85–90. <https://doi.org/10.1038/35011084>.

- [192] Han MS, Park SY, Shinzawa K, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res* 2008;49:84–97. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700184-JLR200>.
- [193] García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, et al. A Comprehensive Untargeted Metabonomic Analysis of Human Steatotic Liver Tissue by RP and HILIC Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Reveals Important Metabolic Alterations. *J Proteome Res* 2011;10:4825–34. <https://doi.org/10.1021/pr200629p>.
- [194] Orešič M, Hyötyläinen T, Kotronen A, et al. Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia* 2013;56:2266–74. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2981-2>.
- [195] Sekas G, Patton GM, Lincoln EC, et al. Origin of plasma lysophosphatidylcholine: evidence for direct hepatic secretion in the rat. *J Lab Clin Med* 1985;105:190–4.
- [196] Ojala PJ, Hermansson M, Tolvanen M, et al. Identification of alpha-1 acid glycoprotein as a lysophospholipid binding protein: a complementary role to albumin in the scavenging of lysophosphatidylcholine. *Biochemistry* 2006;45:14021–31. <https://doi.org/10.1021/bi061657l>.
- [197] Liu Z, Li H, Zheng Y, et al. Association of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 with the Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Result from the APAC Study. *Sci Rep* 2018;8:10127. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28494-8>.
- [198] Nass KJ, van den Berg EH, Gruppen EG, et al. Plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and phospholipid transfer protein activity independently associate with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Invest* 2018;48:e12988. <https://doi.org/10.1111/eci.12988>.
- [199] Tanaka N, Matsubara T, Krausz KW, et al. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2012;56:118–29. <https://doi.org/10.1002/hep.25630>.
- [200] Hollie NI, Cash JG, Matlib MA, et al. Micromolar changes in lysophosphatidylcholine concentration cause minor effects on mitochondrial permeability but major alterations in function. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841:888–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.11.013>.
- [201] Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G77-84. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00301.2011>.
- [202] Hirsova P, Ibrahim SH, Krishnan A, et al. Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology* 2016;150:956–67. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.037>.
- [203] Wallner S, Schmitz G. Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids* 2011;164:573–89. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.008>.
- [204] Puri P, Wiest MM, Cheung O, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009;50:1827–38. <https://doi.org/10.1002/hep.23229>.
- [205] Weir JM, Wong G, Barlow CK, et al. Plasma lipid profiling in a large population-based cohort. *J Lipid Res* 2013;54:2898–908. <https://doi.org/10.1194/jlr.P035808>.
- [206] Vance JE. Lipoproteins secreted by cultured rat hepatocytes contain the antioxidant 1-alk-1-enyl-2-acylglycerophosphoethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1990;1045:128–34. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(90\)90141-j](https://doi.org/10.1016/0005-2760(90)90141-j).
- [207] Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1442–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>.
- [208] Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, et al. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* 1999;338 (Pt 3):769–76.
- [209] Jang JE, Park H-S, Yoo HJ, et al. Protective role of endogenous plasmalogens against hepatic steatosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2017;66:416–31. <https://doi.org/10.1002/hep.29039>.
- [210] Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res* 2010;51:3299–305. <https://doi.org/10.1194/jlr.M009449>.
- [211] Rodriguez-Cuenca S, Pellegrinelli V, Campbell M, et al. Sphingolipids and glycerophospholipids - The “ying and yang” of lipotoxicity in metabolic diseases. *Prog Lipid Res* 2017;66:14–29. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.01.002>.
- [212] Barr J, Vázquez-Chantada M, Alonso C, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based parallel metabolic profiling of human and mouse model serum reveals putative biomarkers associated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res* 2010;9:4501–12. <https://doi.org/10.1021/pr1002593>.

- [213] Li Z, Zhang H, Liu J, et al. Reducing plasma membrane sphingomyelin increases insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* 2011;31:4205–18. <https://doi.org/10.1128/MCB.05893-11>.
- [214] 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. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0025>.
- [215] Kotronen A, Seppänen-Laakso T, Westerbacka J, et al. Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum. *Obes Silver Spring Md* 2010;18:937–44. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.326>.
- [216] Meikle PJ, Wong G, Barlow CK, et al. Plasma lipid profiling shows similar associations with prediabetes and type 2 diabetes. *PloS One* 2013;8:e74341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074341>.
- [217] Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* 2010;688:1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1.
- [218] Frangioudakis G, Garrard J, Raddatz K, et al. Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors. *Endocrinology* 2010;151:4187–96. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0250>.
- [219] Nikolova-Karakashian M, Karakashian A, Rutkute K. Role of neutral sphingomyelinases in aging and inflammation. *Subcell Biochem* 2008;49:469–86. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8831-5_18.
- [220] Holland WL, Brozinick JT, Wang L-P, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2007;5:167–79. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.002>.
- [221] Mari M, Colell A, Morales A, et al. Mechanism of mitochondrial glutathione-dependent hepatocellular susceptibility to TNF despite NF-kappaB activation. *Gastroenterology* 2008;134:1507–20. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.073>.
- [222] Kasumov T, Li L, Li M, et al. Ceramide as a Mediator of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Atherosclerosis. *PLOS ONE* 2015;10:e0126910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126910>.
- [223] Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, et al. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem* 2007;282:22678–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704213200>.
- [224] Futatsugi K, Cabral S, Kung DW, et al. Discovery of Ervogastat (PF-06865571): A Potent and Selective Inhibitor of Diacylglycerol Acyltransferase 2 for the Treatment of Non-alcoholic Steatohepatitis. *J Med Chem* 2022;65:15000–13. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01200>.
- [225] Amin NB, Saxena AR, Somayaji V, et al. Inhibition of Diacylglycerol Acyltransferase 2 Versus Diacylglycerol Acyltransferase 1: Potential Therapeutic Implications of Pharmacology. *Clin Ther* 2023;45:55–70. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2022.12.008>.
- [226] Min H-K, Kapoor A, Fuchs M, et al. Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab* 2012;15:665–74. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.004>.
- [227] Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, et al. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 2009;50:789–96. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.016>.
- [228] Gan LT, Van Rooyen DM, Koina ME, et al. Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *J Hepatol* 2014;61:1376–84. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.024>.
- [229] Walle P, Takkunen M, Männistö V, et al. Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity. *Metabolism* 2016;65:655–66. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.01.011>.
- [230] Zheng J-S, Xu A, Huang T, et al. Low Docosahexaenoic Acid Content in Plasma Phospholipids is Associated with Increased Non-alcoholic Fatty Liver Disease in China. *Lipids* 2012;47:549–56. <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3671-4>.
- [231] Musso G, Gambino R, De Michieli F, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:909–16. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50132>.

- [232] Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, et al. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 2009;284:5637–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807616200>.
- [233] Loomba R, Quehenberger O, Armando A, et al. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res* 2015;56:185–92. <https://doi.org/10.1194/jlr.P055640>.
- [234] Chong MF-F, Hodson L, Bickerton AS, et al. Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. *Am J Clin Nutr* 2008;87:817–23. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.817>.
- [235] Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3077–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>.
- [236] López-Vicario C, González-Pérez A, Rius B, et al. Molecular interplay between $\Delta 5/\Delta 6$ desaturases and long-chain fatty acids in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2014;63:344–55. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303179>.
- [237] Sui Y-H, Luo W-J, Xu Q-Y, et al. Dietary saturated fatty acid and polyunsaturated fatty acid oppositely affect hepatic NOD-like receptor protein 3 inflammasome through regulating nuclear factor-kappa B activation. *World J Gastroenterol* 2016;22:2533–44. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i8.2533>.
- [238] Lytle KA, Depner CM, Wong CP, et al. Docosahexaenoic acid attenuates Western diet-induced hepatic fibrosis in Ldlr^{-/-} mice by targeting the TGF β -Smad3 pathway. *J Lipid Res* 2015;56:1936–46. <https://doi.org/10.1194/jlr.M061275>.
- [239] Valente M, Dentoni M, Bellizzi F, et al. Specialized Pro-Resolving Mediators in Neuroinflammation: Overview of Studies and Perspectives of Clinical Applications. *Molecules* 2022;27:4836. <https://doi.org/10.3390/molecules27154836>.
- [240] Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, et al. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 2009;50:574–85. <https://doi.org/10.1194/jlr.D800028-JLR200>.
- [241] van der Veen JN, Lingrell S, Vance DE. The membrane lipid phosphatidylcholine is an unexpected source of triacylglycerol in the liver. *J Biol Chem* 2012;287:23418–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381723>.
- [242] Serkova NJ, Standiford TJ, Stringer KA. The emerging field of quantitative blood metabolomics for biomarker discovery in critical illnesses. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:647–55. <https://doi.org/10.1164/rccm.201103-0474CI>.
- [243] Friedrich N. Metabolomics in diabetes research. *J Endocrinol* 2012;215:29–42. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0120>.
- [244] Saude EJ, Slupsky CM, Sykes BD. Optimization of NMR analysis of biological fluids for quantitative accuracy. *Metabolomics* 2006;2:113–23. <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0023-5>.
- [245] Gerothanassis IP, Trovanis A, Exarchou V, et al. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY: BASIC PRINCIPLES AND PHENOMENA, AND THEIR APPLICATIONS TO CHEMISTRY, BIOLOGY AND MEDICINE. *Chem Educ Res Pract* 2002;3:229–52. <https://doi.org/10.1039/B2RP90018A>.
- [246] Μαυρομούστακος Θ., Μ.Ι. ΝΜΡ. Βασικές Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημείας Τροφίμων και Ποτών. Αθήνα: Εκδ. Γ.Β.Παρισιάνος; 2006.
- [247] L.G.Wade. Οργανική Χημεία. 7η έκδοση. Θεσσαλονίκη: εκδόσεις Τζιόλα; 2012.
- [248] Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:263–9. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>.
- [249] Chen Y, Li E-M, Xu L-Y. Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites* 2022;12:357. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>.
- [250] Kostara CE, Ferrannini E, Bairaktari ET, et al. Early Signs of Atherogenic Features in the HDL Lipidomes of Normolipidemic Patients Newly Diagnosed with Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* 2020;21:8835. <https://doi.org/10.3390/ijms21228835>.
- [251] Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr Metab* 2018;15:33. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0271-1>.
- [252] Goffredo M, Santoro N, Tricò D, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature Characterizes Obese Adolescents with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* 2017;9:642. <https://doi.org/10.3390/nu9070642>.

- [253] Kaikkonen JE, Würtz P, Suomela E, et al. Metabolic profiling of fatty liver in young and middle-aged adults: Cross-sectional and prospective analyses of the Young Finns Study. *Hepatology* 2017;65:491–500. <https://doi.org/10.1002/hep.28899>.
- [254] Yamakado M, Tanaka T, Nagao K, et al. Plasma amino acid profile associated with fatty liver disease and co-occurrence of metabolic risk factors. *Sci Rep* 2017;7:14485. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14974-w>.
- [255] Cheng S, Wiklund P, Autio R, et al. Adipose Tissue Dysfunction and Altered Systemic Amino Acid Metabolism Are Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PloS One* 2015;10:e0138889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138889>.
- [256] Hasegawa T, Iino C, Endo T, et al. Changed Amino Acids in NAFLD and Liver Fibrosis: A Large Cross-Sectional Study without Influence of Insulin Resistance. *Nutrients* 2020;12:1450. <https://doi.org/10.3390/nu12051450>.
- [257] Han J, Dzierlenga AL, Lu Z, et al. Metabolomic profiling distinction of human nonalcoholic fatty liver disease progression from a common rat model. *Obes Silver Spring Md* 2017;25:1069–76. <https://doi.org/10.1002/oby.21855>.
- [258] Newgard CB, An J, Bain JR, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab* 2009;9:311–26. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>.
- [259] Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:723–36. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.171>.
- [260] Dimou A, Tsimihodimos V, Bairaktari E. The Critical Role of the Branched Chain Amino Acids (BCAAs) Catabolism-Regulating Enzymes, Branched-Chain Aminotransferase (BCAT) and Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase (BCKD), in Human Pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2022;23:4022. <https://doi.org/10.3390/ijms23074022>.
- [261] White PJ, McGarrah RW, Grimsrud PA, et al. The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid Metabolism via Regulation of ATP-Citrate Lyase. *Cell Metab* 2018;27:1281–1293.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.015>.
- [262] Nilsen MS, Jersin RÅ, Ulvik A, et al. 3-Hydroxyisobutyrate, A Strong Marker of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes and Obesity That Modulates White and Brown Adipocyte Metabolism. *Diabetes* 2020;69:1903–16. <https://doi.org/10.2337/db19-1174>.
- [263] Robinson EJ, Taddeo MC, Chu X, et al. Aqueous Metabolite Trends for the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Female Bariatric Surgery Patients by Targeted 1H-NMR Metabolomics. *Metabolites* 2021;11:737. <https://doi.org/10.3390/metabo11110737>.
- [264] Moghei M, Tavajohi-Fini P, Beatty B, et al. Ketoisocaproic acid, a metabolite of leucine, suppresses insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle cells in a BCAT2-dependent manner. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2016;311:C518–27. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00062.2016>.
- [265] Würtz P, Mäkinen V-P, Soininen P, et al. Metabolic Signatures of Insulin Resistance in 7,098 Young Adults. *Diabetes* 2012;61:1372–80. <https://doi.org/10.2337/db11-1355>.
- [266] Romero-Ibarguengoitia ME, Vadillo-Ortega F, Caballero AE, et al. Family history and obesity in youth, their effect on acylcarnitine/aminoacids metabolomics and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Structural equation modeling approach. *PloS One* 2018;13:e0193138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193138>.
- [267] Wang T, Chen K, Yao W, et al. Acetylation of lactate dehydrogenase B drives NAFLD progression by impairing lactate clearance. *J Hepatol* 2021;74:1038–52. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.028>.
- [268] Li H, Wang L, Yan X, et al. A proton nuclear magnetic resonance metabolomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res* 2011;10:2797–806. <https://doi.org/10.1021/pr200047c>.
- [269] Toye AA, Dumas ME, Blancher C, et al. Subtle metabolic and liver gene transcriptional changes underlie diet-induced fatty liver susceptibility in insulin-resistant mice. *Diabetologia* 2007;50:1867–79. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0738-5>.
- [270] Lu Q, Mei Z, Xie H, et al. Metabolic Changes of Hepatocytes in NAFLD. *Front Physiol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.710420>.
- [271] Bae J, Lee B-W. Association between Impaired Ketogenesis and Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. *Biomolecules* 2023;13:1506. <https://doi.org/10.3390/biom13101506>.
- [272] Mey JT, Erickson ML, Axelrod CL, et al. β -Hydroxybutyrate is reduced in humans with obesity-related NAFLD and displays a dose-dependent effect on skeletal muscle mitochondrial respiration in vitro. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 2020;319:E187–95. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00058.2020>.

- [273] Post A, Garcia E, van den Berg EH, et al. Nonalcoholic fatty liver disease, circulating ketone bodies and all-cause mortality in a general population-based cohort. *Eur J Clin Invest* 2021;51:e13627. <https://doi.org/10.1111/eci.13627>.
- [274] Männistö VT, Simonen M, Hyysalo J, et al. Ketone body production is differentially altered in steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in obese humans. *Liver Int* 2015;35:1853–61. <https://doi.org/10.1111/liv.12769>.
- [275] Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis* 2003;41:S4–12. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(03)00112-4).
- [276] Li P, Liu Y, Zhang Y, et al. Effect of non-esterified fatty acids on fatty acid metabolism-related genes in calf hepatocytes cultured in vitro. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2013;32:1509–16. <https://doi.org/10.1159/000356588>.
- [277] Newgard CB. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab* 2012;15:606–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.024>.
- [278] Schooneman MG, Vaz FM, Houten SM, et al. Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes* 2013;62:1–8. <https://doi.org/10.2337/db12-0466>.
- [279] Mardinoglu A, Agren R, Kampf C, et al. Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* 2014;5:3083. <https://doi.org/10.1038/ncomms4083>.
- [280] Cheng S, Rhee EP, Larson MG, et al. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 2012;125:2222–31. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067827>.
- [281] Bianchi G, Marchesini G, Brunetti N, et al. Impaired insulin-mediated amino acid plasma disappearance in non-alcoholic fatty liver disease: a feature of insulin resistance. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver* 2003;35:722–7. [https://doi.org/10.1016/s1590-8658\(03\)00416-x](https://doi.org/10.1016/s1590-8658(03)00416-x).
- [282] Chiara FD, Heebøll S, Marrone G, et al. Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2018;69:905–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.023>.
- [283] Eriksen PL, Vilstrup H, Rigbolt K, et al. Non-alcoholic fatty liver disease alters expression of genes governing hepatic nitrogen conversion. *Liver Int* 2019;39:2094–101. <https://doi.org/10.1111/liv.14205>.
- [284] Gallego-Durán R, Ampuero J, Pastor-Ramírez H, et al. Liver injury in non-alcoholic fatty liver disease is associated with urea cycle enzyme dysregulation. *Sci Rep* 2022;12:3418. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06614-9>.
- [285] Robin P da S, Brandon J E, Rafael D. One-Carbon Metabolism in Fatty Liver Disease and Fibrosis: One-Carbon to Rule Them All. *J Nutr* 2020;150:994–1003. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa032>.
- [286] Sookoian S, Puri P, Castaño GO, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with a state of betaine-insufficiency. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2017;37:611–9. <https://doi.org/10.1111/liv.13249>.
- [287] Stead LM, Brosnan JT, Brosnan ME, et al. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? 1 2 3. *Am J Clin Nutr* 2006;83:5–10. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.1.5>.
- [288] Lyman RL, Giotas C, Medwadowski B, et al. Effect of low methionine, choline deficient diets upon major unsaturated phosphatidyl choline fractions of rat liver and plasma. *Lipids* 1975;10:157–67. <https://doi.org/10.1007/BF02534154>.
- [289] Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004;40:47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.09.020>.
- [290] Ripps H, Shen W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. *Mol Vis* 2012;18:2673–86.
- [291] Gentile CL, Nivala AM, Gonzales JC, et al. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R1710–22. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00677.2010>.
- [292] Murakami S, Ono A, Kawasaki A, et al. Taurine attenuates the development of hepatic steatosis through the inhibition of oxidative stress in a model of nonalcoholic fatty liver disease in vivo and in vitro. *Amino Acids* 2018;50:1279–88. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2605-8>.
- [293] Arefhosseini S, Roshanravan N, Tutunchi H, et al. Myo-inositol supplementation improves cardiometabolic factors, anthropometric measures, and liver function in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Front Nutr* 2023;10:1092544. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1092544>.
- [294] Arefhosseini S, Roshanravan N, Asghari S, et al. Expression of inflammatory genes, WBC-derived inflammatory biomarkers and liver function indices: Effects of myo-inositol

- supplementation in obese patients with NAFLD. *J Funct Foods* 2023;104:105524. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105524>.
- [295] Paulusma CC, Lamers WH, Broer S, et al. Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited. *Biochem Pharmacol* 2022;201:115074. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115074>.
- [296] Sarabhai T, Roden M. Hungry for your alanine: when liver depends on muscle proteolysis. *J Clin Invest* n.d.;129:4563–6. <https://doi.org/10.1172/JCI131931>.
- [297] Chen S, Akter S, Kuwahara K, et al. Serum amino acid profiles and risk of type 2 diabetes among Japanese adults in the Hitachi Health Study. *Sci Rep* 2019;9:7010. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43431-z>.
- [298] Mocciaro G, Allison M, Jenkins B, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is characterised by a reduced polyunsaturated fatty acid transport via free fatty acids and high-density lipoproteins (HDL). *Mol Metab* 2023;73:101728. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101728>.
- [299] Wattacheril J, Seeley EH, Angel P, et al. Differential intrahepatic phospholipid zonation in simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *PloS One* 2013;8:e57165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057165>.
- [300] Timmins JM, Lee J-Y, Boudyguina E, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005;115:1333–42. <https://doi.org/10.1172/JCI23915>.
- [301] Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:1052–62. <https://doi.org/10.1172/JCI27352>.
- [302] 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;282:25123–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704590200>.
- [303] 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;114:1301–9. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621433>.
- [304] Yao ZM, Vance DE. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1988;263:2998–3004.
- [305] Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:754–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.09.009>.
- [306] Fujita K, Nozaki Y, Wada K, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* 2009;50:772–80. <https://doi.org/10.1002/hep.23094>.
- [307] Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, et al. HDL Biogenesis, Remodeling, and Catabolism. In: von Eckardstein A, Kardassis D, editors. *High Density Lipoproteins Biol. Underst. Clin. Exploit.*, Cham: Springer International Publishing; 2015, p. 53–111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_2.
- [308] Albers JJ, Vuletich S, Cheung MC. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:345–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.013>.
- [309] Fadaei R, Poustchi H, Meshkani R, et al. Impaired HDL cholesterol efflux capacity in patients with non-alcoholic fatty liver disease is associated with subclinical atherosclerosis. *Sci Rep* 2018;8:11691. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29639-5>.
- [310] Rye K-A, Jauhiainen M, Barter PJ, et al. Triglyceride-enrichment of high density lipoproteins enhances their remodelling by phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 1998;39:613–22. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33299-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33299-5).
- [311] van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, et al. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Membr Lipid Ther Drugs Target Biomembr* 2017;1859:1558–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>.
- [312] Law S-H, Chan M-L, Marathe GK, et al. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:1149. <https://doi.org/10.3390/ijms20051149>.
- [313] Kartsoli S, Kostara CE, Tsimihodimos V, et al. Lipidomics in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2020;12:436–50. <https://doi.org/10.4254/wjh.v12.i8.436>.
- [314] Liu Z, Li H, Zheng Y, et al. Association of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 with the Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Result from the APAC Study. *Sci Rep* 2018;8:10127–10127. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28494-8>.

- [315] Colak Y, Senates E, Ozturk O, et al. Association of serum lipoprotein-associated phospholipase A2 level with nonalcoholic fatty liver disease. *Metab Syndr Relat Disord* 2012;10:103–9. <https://doi.org/10.1089/met.2011.0111>.
- [316] Régnier M, Polizzi A, Guillou H, et al. Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie* 2019;159:9–22. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.021>.
- [317] Gordon 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:e22775–e22775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022775>.
- [318] Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, et al. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2012;23:365–71. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.04.005>.
- [319] Paul B, Lewinska M, Andersen JB. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer. *JHEP Rep Innov Hepatol* 2022;4:100479. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100479>.
- [320] Perakakis N, Polyzos SA, Yazdani A, et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis with the use of omics and supervised learning: A proof of concept study. *Metabolism* 2019;101:154005. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154005>.
- [321] Draijer LG, Froon-Torenstra D, van Weeghel M, et al. Lipidomics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Exploring Serum Lipids as Biomarkers for Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2020;71:433. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002875>.
- [322] Papathanasiou A, Kostara C, Cung M-T, et al. Analysis of the composition of plasma lipoproteins in patients with extensive coronary heart disease using ¹H NMR spectroscopy. *Hell J Cardiol HJC Hell Kardiologike Epiteorese* 2008;49:72–8.
- [323] Sparks DL, Davidson WS, Lund-Katz S, et al. Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability. *J Biol Chem* 1995;270:26910–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26910>.
- [324] Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye K-A. The Conformation of Apolipoprotein A-I in High-Density Lipoproteins Is Influenced by Core Lipid Composition and Particle Size: A Surface Plasmon Resonance Study. *Biochemistry* 2000;39:5712–21. <https://doi.org/10.1021/bi992902m>.
- [325] Skeggs JW, Morton RE. LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport. *J Lipid Res* 2002;43:1264–74.
- [326] Greene DJ, Skeggs JW, Morton RE. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J Biol Chem* 2001;276:4804–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008725200>.
- [327] Kinoshita M, Fujita M, Usui S, et al. Scavenger receptor type BI potentiates reverse cholesterol transport system by removing cholesterol ester from HDL. *Atherosclerosis* 2004;173:197–202. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2003.12.014>.
- [328] Baker PW, Rye KA, Gamble JR, et al. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res* 2000;41:1261–7.
- [329] Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The Class B Scavenger Receptors SR-BI and CD36 Are Receptors for Anionic Phospholipids *. *J Biol Chem* 1995;270:16221–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.27.16221>.
- [330] Stamler CJ, Breznan D, Neville TA-M, et al. Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport in vivo. *J Lipid Res* 2000;41:1214–21. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33428-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33428-3).
- [331] Darabi M, Guillas-Baudouin I, Le Goff W, et al. Therapeutic applications of reconstituted HDL: When structure meets function. *Pharmacol Ther* 2016;157:28–42. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.10.010>.
- [332] Ozerova IN, Perova NV, Shchel'tsyna NV, et al. Parameters of high-density lipoproteins in patients with arterial hypertension in combination with other components of metabolic syndrome. *Bull Exp Biol Med* 2007;143:320–2. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0100-4>.
- [333] Rached F, Lhomme M, Camont L, et al. Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:1254–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.05.007>.
- [334] Kadowaki H, Patton G, Robins S. Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. *J Lipid Res* 1992;33:1689–98. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)41391-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)41391-4).

- [335] Bolin DJ, Jonas A. Sphingomyelin inhibits the lecithin-cholesterol acyltransferase reaction with reconstituted high density lipoproteins by decreasing enzyme binding. *J Biol Chem* 1996;271:19152–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19152>.
- [336] Kostara CE, Papathanasiou A, Cung MT, et al. Evaluation of established coronary heart disease on the basis of HDL and non-HDL NMR lipid profiling. *J Proteome Res* 2010;9:897–911. <https://doi.org/10.1021/pr900783x>.