



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Πρωτεομική ανάλυση της μη-αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος σε *in vitro* μοντέλα πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων.

Εκπόνηση στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ζαρείφη Β. Δανάη-Στέλλα

Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Επίκ. Καθηγητής (επιβλέπων)

Αθήνα 2017

Μεταπτυχιακή Μελέτη

**Πρωτεομική ανάλυση της μη-αλκοολικής λιπώδους νόσου
του ήπατος σε *in vitro* μοντέλα πρωτογενών ανθρώπινων
ηπατοκυττάρων.**

Εκπόνηση στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, Σχολή
Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ζαρείφη Β. Δανάη-Στέλλα

Τριμελής Επιτροπή:

Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Επίκ. Καθηγητής (επιβλέπων)

Ντούνη Ελένη, Επίκ. Καθηγήτρια

Λάμπρου Νικόλαος, Αν. Καθηγητής

Περίληψη

Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι η πιο κοινή ηπατική νόσος στον κόσμο, με παρουσία έως και 30% στις ανεπτυγμένες χώρες. Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος χαρακτηρίζεται από την παρουσία ηπατικής στεάτωσης, απουσία αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ, και περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος ασθενειών, από απλή στεάτωση έως μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα, ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η αιτία και η μηχανισμοί εξέλιξης της νόσου δεν είναι επαρκώς κατανοητοί. Τα τελευταία χρόνια ακολουθούνται πολυ-ομικές προσεγγίσεις, αλλά δεν υπάρχει – εν γνώση μας – έρευνα που να μελετά την νόσο σε επίπεδο κυτταρικής σηματοδότησης. Την ίδια στιγμή, οι φωσφο-πρωτεομικές μετρήσεις αναδεικνύονται σε σημαντικό εργαλείο για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

In vitro έκθεση πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ελεύθερων λιπαρών οξέων και στεατογενικών φαρμάκων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση συσσώρευσης ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λίπους, όπως παρατηρείται και σε ασθενείς με μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

Η ενδοκυτταρική συσσώρευση σταγονιδίων λίπους διαπιστώθηκε μέσω high content screening: για τη χρώση των σταγονιδίων λίπους χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική Nile Red, ενώ για τη χρώση των πυρήνων το Hoechst 33342. Μετά από 24 ώρες έκθεση των πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων στα ελευθέρω λιπαρά οξέα και στα στεατογενικά φάρμακα, έγινε λύση των κυττάρων και απομόνωση των πρωτεϊνών. Μετρήθηκαν 19 φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες με χρήση της τεχνολογίας Lumiplex (πολλαπλή ELISA βασιζόμενη σε μικροσφαιρίδια). Βρέθηκε πως τα επίπεδα της AKT1 ήταν τρεις φορές λιγότερα από την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Παρατηρήθηκαν επίσης μη-κανονικά μοτίβα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών IKBA, AKT1, WNK1, FAK1 και STAT6, οι περισσότερες από τις οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό εκδήλωσης και εξέλιξης της νόσου.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver condition in the world, with a prevalence of up to 30% in developed countries. NAFLD is defined by the presence of hepatic steatosis in the absence of excess alcohol consumption and represents a spectrum of disease, from simple steatosis and Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) to fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The cause and disease progression mechanisms of NAFLD are still not completely understood. Researchers have tried to understand the disease through multi-omic approaches but there is no study - to our knowledge- exploring the signal transduction level, while phosphoproteomic measurements are becoming very important in drug discovery.

In vitro exposure of primary human hepatocytes to increasing concentrations of free fatty acids (FFA) and steatogenic compounds results in increased intracellular accumulation of lipid droplets similar to those observed in patients with NAFLD and NASH.

The formation of intracellular lipid droplets was verified using high content screening; lipid droplets were stained with Nile Red fluorescent probe and Hoechst 33342 was used for counterstaining cell nucleus. After a 24h treatment, we lysed the cells, measured the protein content of the lysates and adjusted the samples to the same concentration. After pooling 5 replicates of each FFA concentration, we measured 19 phosphorylated protein targets using Luminex technology (multiplex antibody-based ELISA).

We found that the phosphorylation level of AKT1 was three-fold less than the control. Moreover, we show irregular phosphorylation patterns in IKBA, AKT1, WNK1, FAK1 and STAT6, most of which play a role in NAFLD/NASH mechanism.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Ορισμός.....	1
1.2. Επιδημιολογία.....	1
1.3. Φυσική ιστορία.....	2
1.4. Μοριακοί μηχανισμοί παθογένεσης.....	3
1.4.1. Η υπόθεση «δύο χτυπημάτων»	3
1.4.2. Η υπόθεση «πολλών χτυπημάτων»	3
1.4.3. Γενετικοί παράγοντες.....	12
1.4.4. Επιγενετικοί παράγοντες.....	13
1.4.5. Διαιτητικοί παράγοντες.....	14
1.5. Διάγνωση.....	16
1.6. Θεραπεία.....	17
1.6.1. Απώλεια βάρους.....	17
1.6.2. Φαρμακολογικοί παράγοντες.....	18
1.7. State-of-the-art: ερευνητικές στρατηγικές για τη μελέτη της Μη Αλκοολικής Λιπώδης Νόσου του Ήπατος.....	21
1.7.1. Ελεύθερα λιπαρά οξέα της διατροφής.....	21
1.7.2. Εξωγενής χορήγηση στεατογενικών φαρμακευτικών ουσιών.....	23
1.8. State-of-the-art: in vitro μοντέλα για τη μελέτη της Μη Αλκοολικής Λιπώδης Νόσου του Ήπατος.....	34
1.8.1. Μονοστρωματικές καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων.....	34
1.8.2. Μονοστρωματικές καλλιέργειες ηπατικών κυτταρικών σειρών.....	35
1.8.3. Συν-καλλιέργειες.....	36
1.8.4. Καλλιέργειες sandwich.....	37
1.8.5. Σφαιροειδής καλλιέργειες.....	37
1.8.6. Υψηλής ακρίβειας ηπατικές τομές.....	38
1.9. In vitro Βιοδείκτες	39
1.9.1. Βιοδείκτες απόπτωσης.....	39
1.9.2. Αδιποκίνες.....	40
1.9.3. Κυτοκίνες και βιοδείκτες φλεγμονής.....	41
1.9.4. Βιοδείκτες ηπατικής ίνωσης – συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας.....	43
1.9.5. Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.....	44
1.9.6. Ομικές τεχνολογίες και βιοδείκτες.....	44
1.10. Σκοπός της έρευνας.....	48
2. Υλικά και μέθοδοι.....	50
2.1. Καλλιέργεια Κυττάρων.....	50
2.2. Επαγωγή Μη Αλκοολικής Λιπώδης Νόσου του Ήπατος.....	50
2.3. Μέθοδος Resazurin για τη μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας – Καμπύλες δόσης-επιβίωσης.....	51
2.4. Μέτρηση παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)	54
2.5. High Content Screening των σταγονιδίων λιπιδίων.....	55
2.6. Λύση κυττάρων – Συλλογή πρωτεϊνών.....	55
2.7. Μέθοδος BCA για την μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	56

2.8.	Multiplex ELISA - Πρωτεομική ανάλυση	57
3.	Αποτελέσματα	61
3.1.	Καμπύλες δόσεις-επιβίωσης.....	61
3.2.	High Content Screening των σταγονιδίων λιπιδίων	64
3.3.	Image analysis.....	66
3.4.	Ποσοτικοποίηση της παραγωγής ενδοκυτταρικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS)	68
3.5.	Πρωτεομική Ανάλυση – MultiPlex ELISA.....	69
4.	Συμπεράσματα.....	72
5.	Βιβλιογραφία.....	73

1. Εισαγωγή

1.1. Ορισμός

Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; NAFLD) ανάγεται σταδιακά σε μείζων θέμα παγκόσμιας υγείας λόγω της αυξανόμενης εμφάνισης παχυσαρκίας σε παιδιά και ενήλικες.

Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι η ηπατική συνιστώσα του μεταβολικού συνδρόμου και ορίζεται ως η συσσώρευση λίπους στο ηπατικό παρέγχυμα χωρίς φλεγμονή, απουσία αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ (λιγότερο από 21 μονάδες στους άνδρες και 14 μονάδες στις γυναίκες). [1]

Ο όρος NAFLD αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων, από απλή στεάτωση έως στεατοηπατίτιδα (Non-alcoholic Steatohepatitis; NASH), ίνωση, κύρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma; HCC), με όλες τις κλινικές προεκτάσεις τους.

Σχετίζεται στενά με ανοχή στην ινσουλίνη και άλλους παράγοντες παχυσαρκίας, όπως ο διαβήτης, η κεντρική κοιλιακή παχυσαρκία και η δυσλιπιδαιμία. Αποτελεί επίσης ανεξάρτητο παράγοντα ρίσκου για καρδιοαγγειακές παθήσεις ανεξαρτήτως ηλικίας, φύλου και χοληστερίνης. Σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο θνητότητας από κάθε αίτιο, στο οποίο συμβάλλουν τόσο παράγοντες που σχετίζονται με το ήπαρ όσο και δευτερογενείς παράγοντες, όπως κακοήθειες, διαβήτης και στεφανιαία νόσος. [2]

1.2. Επιδημιολογία

Η επικράτηση της μη-αλκοολικής λιπώδης νόσου του ήπατος σε άτομα φυσιολογικού βάρους, χωρίς παρουσία μεταβολικών παραγόντων κινδύνου εμφανίζεται να είναι 16%, και ανέρχεται σε 43-60% σε ασθενείς με διαβήτη, και έως 91% σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία. Η επικράτηση της αυξάνεται επίσης με την ηλικία, από λιγότερο του 20% σε άτομα κάτω των 20 ετών, σε περισσότερο από 60% σε άτομα άνω των 60. Συγκεκριμένα, η ηλικία έχει αποδειχθεί ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη στεάτωσης, και εξέλιξης σε ίνωση και κίρρωση. Το αρσενικό φύλο έχει αποδειχθεί ανεξάρτητος παράγοντας για την εξέλιξη της νόσου σε NASH και ίνωση. [3] Παρόλο που παλαιότερες έρευνες πρότειναν πως η εθνικότητα επηρεάζει την επικράτηση της νόσου, επόμενες έρευνες πολύ-παραγοντικών αναλύσεων δεν το επιβεβαιώνουν. Παραδόξως ωστόσο, η σύνδεση μεταξύ ανοχής στην ινσουλίνη και ο κίνδυνος για ανάπτυξη NASH είναι σημαντικά διαφορετικό σε άτομα Λατινικής προέλευσης σε σύγκριση με αυτά μη-Λατινικής. [4]

Η θνησιμότητα είναι αυξημένη σε ασθενείς με στεατοηπατίτιδα και προχωρημένη ίνωση, αλλά όχι σε ασθενείς χωρίς αυτά, γνωστή και ως μεμονωμένη στεάτωση ή «λιπώδης διήθηση». Εκτεταμένη έρευνα 129 ασθενών με αποδεδειγμένη μέσω βιοψίας NAFLD, έδειξε πως η θνησιμότητα δεν είναι αυξημένη σε ασθενείς με απλή στεάτωση, αλλά αυξημένη σε ασθενείς με NASH. Η θνησιμότητα σχετίστηκε κυρίως με καρδιαγγειακή νόσο, αν και θάνατοι σχετιζόμενοι με το ήπαρ είναι πιο συχνόι σε ασθενείς με NASH κίρρωση. [5] Πρόσφατη συστηματική έρευνα 221 ασθενών με αποδεδειγμένη από βιοψία NASH, έδειξε ότι η ηλικία του ασθενούς και ο βαθμός φλεγμονής στην αρχική βιοψία του ήπατος είναι ανεξάρτητοι παράγοντες πρόβλεψης για την εξέλιξη σε ίνωση, ενώ παράγοντες όπως ο διαβήτης η υπέρταση και η παχυσαρκία δεν αποτελούν στατιστικά σημαντικούς παράγοντες πρόβλεψης. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν πως η παρουσία αυξημένης ίνωσης σχετίζεται με αυξημένη ολική θνησιμότητα πιθανότατα λόγω καρδιαγγειακής νόσου. [6]

Οι Hamabe et al., σε μια έρευνα ανασκόπησης 10 ετών, έδειξαν πως το κάπνισμα είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη NAFLD, ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων μεταβολικών παραγόντων κινδύνου. Πρέπει να σημειωθεί πως ο ρυθμός ανάπτυξης NAFLD σε άτομα που διέκοψαν το κάπνισμα ήταν παρόμοιος με αυτών που συνέχισαν, πιθανότατα λόγω της επακόλουθης αύξησης βάρους. [7]

Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (ένα αλκοολούχο ποτό την ημέρα) δεν φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη NAFLD, ενώ αντίθετα μέτρια κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να μειώνει την εμφάνιση της. [8]

1.3. Φυσική Ιστορία

Η φυσική ιστορία και η παθογένεση της NAFLD δεν είναι επαρκώς τεκμηριωμένη. Στη NAFLD, η απλή στεάτωση ορίζεται ως η παρουσία λίπους σε <5% των ηπατοκυττάρων και σε περίπου 20-25% των περιπτώσεων εξελίσσεται σε NASH. Από τους ασθενείς με NASH το 20% θα αναπτύξει ίνωση και τελικά κίρρωση.

Οι μηχανισμοί εξέλιξης της στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα είναι περίπλοκοι και όχι πλήρως κατανοητοί, αν και αυξημένη κοιλιακή παχυσαρκία και ανοχή στην ινσουλίνη με αυξημένη απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη στην ηπατική στεάτωση. Σε υγιή κατάσταση η ινσουλίνη προάγει την ηπατική και περιφερική πρόσληψη γλυκόζης και καταστέλλει την προαγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, ενώ αντίθετα, σε κατάσταση νηστείας, το ήπαρ είναι το κατεξοχήν όργανο παραγωγής γλυκόζης μέσω γλυκονεογέννεσης και γλυκόλυσης. Σε ασθενείς με ανοχή στην ινσουλίνη η ηπατική αυτό-ρύθμιση διαταράσσεται και κατά συνέπεια, τόσο η γλυκονεογέννεση όσο και η γλυκόλυση αυξάνονται οδηγώντας σε υπεργλυκαιμία.

Οι μηχανισμοί ηπατικής βλάβης στη NAFLD θεωρούνται πλέον μια διαδικασία «πολλαπλών χτυπημάτων» που περιλαμβάνει ανοχή στην ινσουλίνη, οξειδωτικό στρες, απόπτωση και διατάραξη των επιπέδων των αδιποκινών.[9]

1.4. Μοριακοί μηχανισμοί παθογένεσης

1.4.1. Η υπόθεση «δύο χτυπημάτων»

Το μοντέλο «δύο χτυπημάτων στη NAFLD» προτάθηκε το 1998 από τους Day et al.. Το πρώτο χτύπημα αφορά τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων (Triglycerides; TG) και ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids; FFA) στα ηπατοκύτταρα, ως αποτέλεσμα ανοχής στην ινσουλίνη, ενισχυμένης εισροής λιπιδίων μέσω της διατροφής και αυξημένης ηπατικής λιπογένεσης. Το δεύτερο χτύπημα περιλαμβάνει υπεροξειδωση των λιπιδίων, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, και φλεγμονή, που οδηγούν σε βλάβη των ηπατοκυττάρων και ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού προ-φλεγμονής μέσω κυτοκινών και υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων, συμπεριλαμβανομένων των toll-like υποδοχέων, καταλήγει σε δύο κεντρικά ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης: στο μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα κβ (nuclear factor κβ; NF-κβ) και της c-jun αμινοτελικής κινάσης (c-jun N-terminal kinase; JNK). Η ενεργοποίηση του NF-κβ έχει παρατηρηθεί στη NASH και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη μεταγραφή γονιδίων της προ-φλεγμονής, ενώ η JNK προκαλεί ανοχή στην ινσουλίνη μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης και αποδόμησης του υποστρώματος υποδοχέα της ινσουλίνης 1 (insulin receptor substrate 1; IRS1), μειώνοντας τη ενδοκυτταρική σηματοδότηση κάτωθεν του υποδοχέα ινσουλίνης. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να προωθήσει την αναπαραγωγή των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων (hepatic stellate cells; HSC) συμβάλλοντας στην ανάπτυξη ίνωσης. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS) προάγουν την απελευθέρωση κυτοκινών από το ηπατοκύτταρο, που οδηγεί στην έναρξη πολυάριθμων μονοπατιών του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγώντας σε περαιτέρω βλάβη του ήπατος. Ο συνδυασμός υπερινσουλιναϊμίας και υπεροξειδωσης του ηπατικού σιδήρου και λιπιδίων ενισχύει το οξειδωτικό στρες και μπορεί να προκαλέσει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη NASH και να συμβάλλει στην συσσώρευση τριγλυκεριδίων και τελικά στη νέκρωση του κυττάρου. [10]

1.4.2. Η υπόθεση «πολλών χτυπημάτων»

Έγινε γρήγορα αντιληπτό πως η θεώρηση των «δύο χτυπημάτων» ήταν αρκετά απλοϊκή ώστε να συμπεριλάβει την πολυπλοκότητα της ανθρώπινης NAFLD, όπου πολλοί παράλληλοι παράγοντες, δρώντας συνεργάστηκα σε άτομα με γενετική προδιάθεση, εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου. Συνεπώς, η υπόθεση «πολλών χτυπημάτων» έχει πια αντικαταστήσει την υπόθεση «δύο χτυπημάτων».

Διαιτητικές συνήθειες, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε ανάπτυξη ανοχής στην ινσουλίνη, παχυσαρκίας με αναπαραγωγή των λιποκυττάρων και σε αλλαγές στην εντερική μικροχλωρίδα. [9]

1.4.2.1. Μεταβολισμός του λίπους, λιποτοξικότητα και ανοχή στην ινσουλίνη

Το λίπος εισέρχεται στο ήπαρ των ασθενών με NAFLD κυρίως με τη μορφή τριγλυκεριδίων. Τα τριγλυκερίδια προέρχονται από εστεροποίηση της γλυκερόλης και των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids; FFA). Με τη σύνθεση τους, τα τριγλυκερίδια εισέρχονται σε αποθηκευτικά και εκκριτικά κυστίδια που έχουν διακριτούς ρυθμούς εναλλαγών. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προέρχονται είτε από τη διατροφή, είτε από τον λιπώδη ιστό μέσω λιπόλυσης ή/και ηπατικής *de novo* λιπογένεσης (*de novo* lipogenesis; DNL). Στα ηπατοκύτταρα, τα FFA σχηματίζουν ακυλ-CoA λιπαρά οξέα μέσω της δράσης των ακυλ-CoA συνθετασών και υφίσταται εστεροποίηση ή εισέρχονται στο μονοπάτι της β-οξειδωσης.

Η εισροή τριγλυκεριδίων δεν είναι εξ ορισμού ηπατοτοξική και θα μπορούσε να αναπαριστά έναν αμυντικό μηχανισμό εξισορρόπησης της περίσσειας FFA όπως έχειδειχθεί σε μοντέλα μυών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η σύνθεση τριγλυκεριδίων επάγεται για να ελαττώσει την περίσσεια FFAs. Τα τριγλυκερίδια μπορούν να αποθηκευτούν στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων με τη μορφή σταγονιδίων λιπιδίων ή να εκκριθούν στην κυκλοφορία με τη μορφή πρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoproteins; VLDL). [11]

Η αναστολή της συσσώρευσης τριγλυκεριδίων σε νέες λιπο-πρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoproteins; VLDL), μέσω παρεμπόδισης της πρωτεΐνης μεταφοράς μικροσωμικών τριγλυκεριδίων (microsomal triglyceride transfer protein; MTP), προκαλεί ελλαττωματική έκκριση τριγλυκεριδίων και συνεπώς συσσώρευση λιπιδίων χωρίς ηπατική βλάβη. Αναστολή της έκφρασης της διγλυκεριδικής ακυλοτρανσφεράσης 2 (diglyceride acyltransferase 2; DGAT2), ενός ενζύμου κλειδί που εμπλέκεται στον σχηματισμό τριγλυκεριδίων, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων με επακόλουθη αύξηση της οξειδωσης των FFA και επιδείνωση της στεατοηπατίτιδας σε μοντέλα μυών. Συνεπώς, η αυξημένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων είναι ένα επιφανιόμενο που συμβαίνει αυθόρμητα με παραγωγή τοξικών μεταβολιτών, λιποτοξικότητα και ηπατική βλάβη. [12]

Η *de novo* λιπογένεση είναι ένα ολοκληρωμένο μεταβολικό μονοπάτι που περιλαμβάνει τη γλυκόλυση (μετατροπή της γλυκόζης σε ακετυλο-CoA), τη βιοσύνθεση κορεσμένων λιπαρών οξέων που ακολουθείται από αποκορεσμό τους, και την δημιουργία τριγλυκεριδίων στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό. Απορρύθμιση της DNL έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο ή NAFLD. Η DNL αυξάνεται μετά από διατροφή υψηλή σε υδατάνθρακες και χαμηλή σε λιπαρά που οδηγεί σε αύξηση της τριακυλογλυκερόλης στο αίμα και αυξημένη σύνθεση και έκκριση VLDL στο ήπαρ, που με τη σειρά της

προκαλεί υπεργλυκεριδαιμία και στεάτωση. Η ηπατική DNL προκαλείται από εισροή λιπιδίων στο ήπαρ λόγω πρόσληψης πολλών FFA μέσω διατροφής, και λόγω περιφερικής ανοχής στην ινσουλίνη. Αν και ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, έχει προταθεί πως η ηπατική ανοχή στην ινσουλίνη μπορεί να είναι αιτία ή/και αποτέλεσμα στεάτωσης στο ήπαρ. Χρόνια υπερινσουλιναιμία, όπως βρέθηκε στη NAFLD, αυξάνει την DNL μέσω θετικής ρύθμισης λιπογενικών μεταγραφικών παραγόντων. [13]

Η ηπατική *de novo* λιπογένεση (DNL) μπορεί να αυξηθεί κυρίως με ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως η πρωτεΐνη πρόσδεσης του ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης 1 (sterol regulatory element-binding protein 1; SREBP-1), η πρωτεΐνη πρόσδεσης του στοιχείου απόκρισης σε υδρογονάνθρακα (carbohydrate response element-binding protein; ChREBP) και του υποδοχέα πλασματοσυσσωρευτή ενεργοποιημένου υπεροξεισώματος (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR-γ). Ο SREBP-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που υπάρχει σε τρεις ισομορφές: ο SREBP-1c ρυθμίζει την ενεργοποίηση της DNL και ενεργοποιείται από την ινσουλίνη, ρυθμίζει γονίδια απαραίτητα για το μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων και της παραγωγής λιπιδίων, και ο SREBP-2 εμπλέκεται στην κυτταρική ομοιόσταση της χοληστερόλης, συνεπώς η απορρύθμιση τους σχετίζεται με τη συσσώρευση λίπους στο ηπατοκύτταρο. Ο ChREBP ενεργοποιείται από τη γλυκόζη και αυξάνει τη DNL ενώ παρέχει περισσότερο υπόστρωμα για τη σύνθεση FFA και τριγλυκεριδίων. [14]

Ανάμεσα στους υποδοχείς ινσουλίνης, ο υποδοχέας 2 του υποστρώματος ινσουλίνης (insulin receptor substrate 2; IRS-2) μπορεί να λειτουργήσει, όταν είναι ενεργός, ως ρυθμιστής του SREBP1-c, επηρεάζοντας τη DNL. Σε περιπτώσεις ανοχής ινσουλίνης ο IRS-2 ρυθμίζεται αρνητικά και συνεπώς ο SREBP-1 υπερεκφράζεται και η DNL αυξάνεται. Επιπροσθέτως, η β-οξείδωση των FFA αναστέλλεται σε καταστάσεις ανοχής ινσουλίνης προωθώντας περεταίρω τη συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα. [15]

Η δράση του SREBP1-c αναστέλλεται επίσης από την ρυθμιζόμενη από την γλυκόζη πρωτεΐνη GRP78 (glucose regulated protein 78). Η GRP78 είναι μια πρωτεΐνη πρόσδεσης ανοσοσφαιρίνης και σημαντικός ρυθμιστής της λειτουργίας του ενδοπλασματικού δικτύου και σημαντική για την επιβίωση του κυττάρου. Έρευνα έδειξε επιτυχώς πως τα επίπεδα της συνθάσης 1 του φωσφορικού καρβαμυλικού (carbamoyl phosphate synthase 1; CPS1) αλλά και της ρυθμιζόμενης από την γλυκόζη πρωτεΐνης GRP78 (glucose regulated protein 78) μειώνεται σταδιακά από την απλή στεάτωση στη NASH. [13]

Πρόσφατες μελέτες σε τρωκτικά έδειξαν πως στην παχυσαρκία η DNL ρυθμίζεται αρνητικά στον λευκό λιπώδη ιστό και πως η επιλεκτική αποκατάσταση της στο λευκό λιπώδη ιστό αντιστρέφει την ανοχή στην ινσουλίνη που προκαλείται από την παχυσαρκία. Μελέτες στον άνθρωπο υποστηρίζουν αυτά τα δεδομένα. Τα ένζυμα της DNL καταστέλλονται στον λευκό λιπώδη ιστό σε καταστάσεις παχυσαρκίας, όπως και ο μεταφορέας της γλυκόζης 4 (glucose transporter 4; GLUT 4). Αυτή η καταστολή είναι στενά

συνδεδεμένη με ελλαττωματικό έλεγχο του μεταβολισμού και μπορεί να αντιστραφεί με απώλεια βάρους μέσω βαριατρικής εγχείρησης. Αυτό υποδεικνύει πως τα επίπεδα της DNL ή των παραγώγων της, όπως είναι τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, στο λευκό λιπώδη ιστό είναι σημαντικοί παράγοντες καθορισμού συστημικής ανοχής στην ινσουλίνη και μεταβολικών νόσων. Σε αντίθεση με το λευκό λιπώδη ιστό, η DNL στο ήπαρ βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά στην παχυσαρκία τρωκτικών και ανθρώπων όπου πιστεύεται ότι προκαλεί λιποτοξικότητα, ανοχή στην ινσουλίνη, αθηρογενική δυσλιπιδαιμία και NAFLD. Βάσει αυτής της συσχέτισης μεταξύ ηπατικής DNL και μεταβολικού συνδρόμου, θεωρείται πως η αναστολή της DNL μπορεί να αποτελεί μια βιώσιμη προσέγγιση της θεραπείας ασθενειών που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Ανεξάρτητα από το μηχανισμό, οι ασθενείς με NAFLD έχουν αυξημένη DNL που δεν καταστέλλεται μέσω νηστείας και υψηλότερα νυχτερινά επίπεδα FFA στο πλάσμα. [13]

Τα FFA στα ηπατοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης μέσω ενεργοποίησης της κινάσης-σερίνης και να συμβάλλουν στην κατάσταση ανοχής ινσουλίνης. Οι ασθενείς με NAFLD έχουν μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη τόσο στους μύες, όσο και στο ήπαρ και τον λιπώδη ιστό. Λόγω της ανοχής στην ινσουλίνη, ο λιπώδης ιστός καθίσταται ανθεκτικός στην αντι-λιπολυτική δράση της ινσουλίνης με αποτέλεσμα την έναρξη περιφερικής λιπόλυσης που προκαλεί αυξημένη εισροή FFA στο ήπαρ και καθοδηγεί τη DNL. Επιπλέον, η υπερφόρτωση λιπιδίων στα β παγκρεατικά κύτταρα οδηγεί σε απορρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης και αλλαγές στην έκφραση του υποδοχέα ενεργοποιούμενο από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων (peroxisome proliferator-activated receptor α ; PPAR- α), της γλυκοκινάσης, του μεταφορέα της γλυκόζης 2 (glucose transporter-2; GLUT2), της προ-προ-ινσουλίνης και της παγκρεατικής δωδεκαδακτυλικής ομοιοτικής πρωτεΐνης 1 (pancreatic duodenal homeobox-1; PDX-1), που μπορούν να οδηγήσουν σε ανοχή στην ινσουλίνη ως αποτέλεσμα της απόπτωσης των Β κυττάρων που προκαλείται από τα FFA. [9]

Οι μηχανισμοί λιποτοξικότητας ως συνέπεια της εκτοπικής συσσώρευσης λίπους στο ήπαρ δεν έχουν περιγραφεί επαρκώς. Όταν η κατανάλωση ενέργειας είναι λιγότερη από την πρόσληψη, υπάρχει αφθονία ελεύθερων λιπαρών οξέων που οδηγεί σε εκτοπική αποθήκευση λίπους στο μυς και στο ήπαρ. Υπερφόρτωση λιπιδίων μπορεί να βρεθεί και σε άλλα όργανα, όπως η καρδιά, το πάγκρεας και το αρτηριακό τοίχωμα. Οι λιπώδεις ιστοί μπορούν να αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες περίσσειας FFA και όταν αυτή η δυνατότητα εξαντλείται, προκαλείται κυτταρική δυσλειτουργία και θάνατος που είναι γνωστά ως λιποτοξικότητα. Οι μηχανισμοί λιποτοξικότητας περιλαμβάνουν απόπτωση, αυξημένα επίπεδα καρδιολιπίνης, αυξημένη διαπερατότητα μεμβρανών και απελευθέρωση κυτοχρωμάτων στα μιτοχόνδρια, ενεργοποίηση του NF- κ B και οξειδωτικό στρες. Στη NAFLD, η συσσώρευση ηπατικού λίπους θεωρείται συνέπεια της ανισορροπίας μεταξύ πρόσληψης/παραγωγής λίπους στο συκώτι και της επακόλουθης έκκρισης ή μεταβολισμού του. [13]

Άλλα μονοπάτια απόρριψης λίπους, όπως η ελαττωματική οξείδωση λιπαρών οξέων στο ήπαρ ή η μειωμένη σύνθεση και έκκριση VLDL έχουν ελάσσονα σημασία στον προσδιορισμό συσσώρευση λίπους και λιποτοξικότητας στη NAFLD. Η αυτοφαγία, η οποία ρυθμίζει το μεταβολισμό λιπιδίων, μειώνει την ηπατική στεάτωση και καταλήγει σε έναν ατέρμονο κύκλο συσσώρευσης λιπιδίων και περεταίρω καταστολής της αυτοφαγικής λειτουργίας. [16]

Η ανοχή στην ινσουλίνη είναι περισσότερο επικρατούσα στη NASH σε σχέση με την απλή στεάτωση. Ασθενείς με ηπατική στεάτωση και NASH αλλά χωρίς διαβήτη τύπου 2 έχουν μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η ανοχή στην ινσουλίνη είναι ένα από τα «πολλαπλά χτυπήματα» που προετοιμάζει το έδαφος για την ανάπτυξη NAFLD και την εξέλιξη σε NASH, κριτικής σημασίας για την εδραίωση λιποτοξικότητας, οξειδωτικού στρες και έναρξης του σηματοδοτικού καταρράκτη της φλεγμονής.

Σε ασθενείς με NAFLD, τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες παρεμβαίνουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης και συμβάλλουν στη συντήρηση και επιδείνωσης της ανοχής στην ινσουλίνη: φωσφορυλίωση της σερίνης του IRS-2 από σηματοδοτικά μόρια φλεγμονής, όπως η JNK1 ή η κινάση β του αναστολέα του πυρηνικού παράγοντα β (inhibitor of nuclear factor- β kinase- β ; IKK β), και ενεργοποίηση του NF- κ B και των καταστολέων σηματοδότησης κυτοκινών (suppressors of cytokine signaling; SOCS), είναι μερικοί από τους μηχανισμούς που πιθανώς εμποδίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης σε ασθενείς με NAFLD. [17]

1.4.2.2. Δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού

Ο λιπώδης ιστός δεν είναι αδρανής όπως θεωρείται παραδοσιακά, αλλά έχει ενδοκρινή λειτουργία και εκκρίνει ορμόνες (αδιποκίνες) όπως η λεπτίνη και αδιπονεκτίνη. Αποτελεί την κύρια πηγή FFA και είναι υπεύθυνος για το 60% της εισροής τριγλυκεριδίων.

Η υπερτροφία των λιποκυττάρων, λόγω υπεροφόρτωσης λιπιδίων, που σχετίζεται με την παχυσαρκία ή/και την ανοχή στην ινσουλίνη οδηγεί σε ανισορροπία των αδιποκινών που μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο τον λιπώδη ιστό αλλά και το ήπαρ. Το λιπιδικό φορτίο που βρίσκεται σε περίσσεια μπορεί να μετακινηθεί από τον υπερφορτωμένο και δυσλειτουργικό λιπώδη ιστό και να αποθηκευτεί εκτοπικά στο ήπαρ, του μύες αλλά και άλλα όργανα. [13]

Ο λιπώδης ιστός συμβάλει στην διατήρηση χαμηλού βαθμού φλεγμονής, παράγοντας προ-φλεγμονώδης κυτοκίνες: τα επίπεδα IL-6 στον ορό και η έκφραση του TNF- α στο λιποκύτταρο είναι αυξημένα σε παχύσαρκους ασθενείς και ελαττώνεται με απώλεια βάρους. Επιπλέον, αυξημένη έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών φλεγμονής και η ενεργοποίηση των μακροφάγων στον εντόσθιο και υποδόριο λιπώδη ιστό ασθενών με NAFLD συσχετίζεται με την εξέλιξη από απλή στεάτωση σε NASH και ίνωση.

Η λεπτίνη είναι μια 16kDa ανορεξιογινική ορμόνη με προ-φλεγμονώδη δράση που προστατεύει από τη συσσώρευση λιπιδίων σε μη-λιπώδης περιοχές. Στο ήπαρ αυτό επιτυγχάνεται με μείωση της έκφρασης του SREBP-1. Ωστόσο, η λεπτίνη αυξάνεται σε παχύσαρκους ασθενείς ως απόκριση στην ανοχή σε αυτήν και ο προ-ινωτικός της ρόλος έχειδειχθεί σε διάφορα *in vitro* μοντέλα και σε μοντέλα ζώων. Η λεπτίνη ενεργοποιεί τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα μέσω των μονοπατιών Hedgehog και mTOR, και διεγείρει τα κύτταρα κύτταρα Kupffer. Ωστόσο, παρά τη πληθώρα δεδομένων από μοντέλα ζώων, η επίδραση και η σημαντικότητα των επιπέδων λεπτίνης του ορού σε ασθενείς με NAFLD ή NASH είναι ακόμα μη τεκμηριωμένη. [9]

Η αδιπνεκτίνη βελτιώνει την ηπατική και περιφερική ανοχή στην ινσουλίνη και έχει αντι-φλεγμονώδη και ηπατο-προστατευτικό ρόλο. Αυτά επιτυγχάνονται κυρίως μέσω επαύξησης της απακετυλίωσης των σφιγγολιπιδίων κυρίως στα ηπατοκύτταρα, τον καρδιακό μυ στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Ο ηπατο-προστατευτικός της ρόλος αφορά την αναστολή της ηπατικής γλυκονογένεσης και την καταστολή της λιπογένεσης, κυρίως μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από το 5' AMP (5' AMP-activated protein kinase; AMPK) και του PPAR- α , τα οποία αυξάνουν την οξείδωση λιπαρών οξέων στο ήπαρ και τους μύες. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα της σχετίζονται αντιστρεπτά με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων του πλάσματος και θετικά με τα επίπεδα HDL-χοληστερόλης και LDL-χοληστερόλης. [13] Η αντι-φλεγμονώδης δράση επιτυγχάνεται μέσω παρεμπόδισης της ενεργοποίησης του NF- κ B, έκκρισης αντιφλεγμονώδων κυτοκινών και αναστολής της απελευθέρωση προ-φλεγμονώδων κυτοκινών όπως ο TNF- α και η IL-6. Τα αντι-οξειδωτικά της αποτελέσματα ρυθμίζονται μέσω του υποδοχέα της AdipoR1, συνεπώς τα μειωμένα επίπεδα της στην παχυσαρκία μπορεί να έχουν αιτιατό ρόλο στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και στην ανοχή στην ινσουλίνη. [9] Ασθενείς με NAFLD έχουν μικρότερη συγκέντρωση αδιπνεκτίνης σε σχέση με του υγιούς παρά την αυξημένη λιπόλυση και συγκέντρωση λιπαρών οξέων. Συνεπώς, τα χαμηλά επίπεδα αδιπνεκτίνης στη NAFLD αυξάνουν την εισροή FFA και την οξείδωση των λιπιδίων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη από απλή στεάτωση σε NASH. [13] Γενικά, σε παχύσαρκους ασθενείς, μειωμένη αδιπνεκτίνη και αυξημένη λεπτίνη μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική στεάτωση, φλεγμονή και ίνωση.

1.4.2.3. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Δομικές και λειτουργικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στην παθογένεση της NAFLD. Οι δομικές αλλαγές περιλαμβάνουν καταστροφή του μιτοχονδριακού DNA και μορφολογικές αλλαγές, ενώ οι λειτουργικές περιλαμβάνουν την αναπνευστική αλυσίδα και τη μιτοχονδριακή β -οξείδωση.

Εάν τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξεισώματα δεν μπορούν να διαχειριστούν την αυξημένη εισροή λιπιδίων, η αναπνευστική οξείδωση μπορεί να καταρρεύσει με αποτέλεσμα την αδυναμία ομοιόστασης του λίπους,

την παραγωγή τοξικών μεταβολιτών προερχόμενων από τα λιπίδια και την υπερπαραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου. Όλα αυτά τα μόρια ενεργοποιούν μονοπάτια της φλεγμονής συμβάλλοντας στην υπατική νέκρωση μέσω φλεγμονής και επιδεινώνουν τη βλάβη στα μιτοχόνδρια. [18]

Έχει όντως αποδειχθεί πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανοχής στην ινσουλίνη, της παχυσαρκίας, τον επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α ; TNF α) και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Επιπροσθέτως, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου, μαζί με οξειδωμένα σωμάτια χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (low density lipoproteins; LDL), μπορούν να ενεργοποιήσουν τα κύτταρα Kupffer και τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, οδηγώντας σε φλεγμονή και ίνωση. [19]

Ωστόσο, το αν η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι κύριο παθολογικό συμβάν στη NAFLD ή είναι συνέπεια των αλλαγών στο μεταβολισμό λιπιδίων εξακολουθεί να είναι άγνωστο.

1.4.2.4. Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου

Αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών, κύρια δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου και της έλλειψης ATP που μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μπορεί να ενεργοποιήσει τη λεγόμενη «απόκριση σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες» (unfolded protein response; UPR), η οποία αποτελεί προσαρμοστική απόκριση στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Η ενεργοποίηση της UPR περιλαμβάνει προσαρμοστικούς μηχανισμούς, όπως μείωση της σύνθεσης πρωτεϊνών, αυξημένη δυνατότητα μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου, αυξημένη αναδίπλωση και μεταφορά πρωτεϊνών, και ενεργοποίηση μονοπατιών για αποδόμηση πρωτεϊνών, το οποίο βοηθάει στην άμβλυνση της ελλαττωματικής αναδίπλωσης πρωτεϊνών η οποία σε διαφορετικές συνθήκες θα οδηγούσε σε απόπτωση.

Στη NAFLD, οι παράγοντες που προκαλούν UPR περιλαμβάνουν υπεργλυκαιμία, βλάβη των μιτοχονδρίων που εξαντλεί το ATP, υπερχοληστερολαιμία, εξάντληση της φωσφατιδυλχολίνης και οξειδωτικό στρες.

Η UPR οδηγεί σε ενεργοποίηση της JNK, που με την σειρά της ενεργοποιεί μονοπάτια φλεγμονής ή απόπτωσης και η ενεργότητα της φαίνεται να διαχωρίζει άτομα με NASH από αυτά με απλή στεάτωση. Επιπλέον, η ενεργότητα της JNK είναι συνδεδεμένη με ελλαττωματική σηματοδότηση ινσουλίνης και ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη.

Άλλη συνέπεια του UPR αποτελεί η ενεργοποίηση των μονοπατιών του SREBP-1c και συνεπώς η διατήρηση της συσσώρευσης λίπους στο ήπαρ και η επιδείνωση του οξειδωτικού στρες και του UPR. [20]

Η πρωτεΐνη πρόσδεσης x-box 1 (x-box binding protein 1; XBP-1) είναι κύριος ρυθμιστής της UPR και αλληλεπιδρά με το σηματοδοτικό μονοπάτι P13K της ινσουλίνης, με αυξημένη πυρηνική μετατόπιση προκαλούμενη από την ινσουλίνη. Η αλληλεπίδραση του P13K και της XBX-1 ρυθμίζει και ρυθμίζεται από την κυτταρική απόκριση στο στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Η XBX-1 έχει προταθεί λοιπόν ως το η χαμένη σύνδεση μεταξύ στεάτωσης, ανοχής στην ινσουλίνη και φλεγμονής. [21]

1.4.2.5. Κατάσταση φλεγμονής στη NAFLD: IL-6 και TNF-α

Τα αυξημένα επίπεδα FFA και η επακόλουθη λιποτοξικότητα, η ανοχή στην ινσουλίνη, η δυσλειτουργία που περιφερικού λιπώδους ιστού και οι ενδοτοξίνες που προέρχονται από το έντερο συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και διατήρηση της παραγωγής και απελευθέρωσης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, τόσο συστηματικά όσο και τοπικά στο ήπαρ.

Δύο κύρια φλεγμονώδη μονοπάτια, τα JNK-AP-1 και IKK-NF-κB, εμπλέκονται στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής στην NAFLD. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η JNK είναι μια πρωτεϊνική κινάση που σχετίζεται με την ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών και την ανάπτυξη NASH.

Ο NF-κB είναι μεταγραφικός παράγοντας και κύριος ρυθμιστής της φλεγμονώδους αντίδρασης και η IKK2 υπομονάδα του είναι κύριο συστατικό που απαιτείται για την ενεργοποίησή του κατά την οξεία φλεγμονώδη απόκριση. Μόνιμη ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού έχει δειχθεί τόσο σε πειραματικά μοντέλα ζώων με NAFLD όσο και σε ασθενείς με NASH. Η υπερέκφραση του IKK2, που οδηγεί σε μόνιμη ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού στα ηπατοκύτταρα, προκαλεί χρόνια φλεγμονή και ανοχή στην ινσουλίνη. [22]

Ο ρόλος-κλειδί της παραγωγής κυτοκινών στο ήπαρ κατά την εξέλιξη της ηπατικής στεάτωσης σε NASH, υποστηρίζεται από μελέτες σε μοντέλα ζώων που φαίνεται ότι έκθεση του ήπατος σε αυξημένα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτοκινών οδηγεί σε ιστολογικές αλλαγές που τυπικά παρατηρούνται στη NASH, όπως ηπατοκυτταρική νέκρωση και απόπτωση, χημοταξία ουδετερόφιλων, ενεργοποίηση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και ανάπτυξη σωματίων Mallory. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα του TNF-α τόσο στον ορό όσο και στο ήπαρ είναι αυξημένα σε ασθενές με NASH και συσχετίζονται με την ιστολογική βαρύτητα της ηπατικής βλάβης.

Τέλος, η φλεγμονή και η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση και συνεπώς χρόνια φλεγμονή στη NAFLD και ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (hepatocellular carcinoma; HCC).[23]

1.4.2.6. Ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος

Τα φλεγμονοσώματα είναι κυτταροπλασματικά πολύ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα, αποτελούμενα από κασπάσες και μόρια προερχόμενα από παθογόνους μικροοργανισμούς ή από τραυματισμένα κύτταρα, και μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή. Λειτουργούν ως αισθητήρες ενδογενών και εξωγενών παθογόνων σχετιζόμενων με σωματίδια μοριακών μοτίβων (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) ή βλαβών σχετιζόμενων με μοριακά μοτίβα (damage-associated molecular patterns; DAMPs). Ως μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, τα φλεγμονοσώματα συμβάλουν στην ανοσολογική απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Ρυθμίζουν τις προ-φλεγμονώδης κυτοκίνες τελεστές ενεργοποιώντας οικογένειες υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων της γαμετικής σειράς (pattern recognition receptors; PRRs) όπως οι υποδοχείς Toll-like (Toll-like receptors; TLR), οι υποδοχείς NOD-like (nod-like receptors; NLRs) και οι υποδοχείς λεκτίνης τύπου C (C-type lectin receptors; CLRs). Απελευθέρωση των DAMPs μπορεί να προκληθεί από διάφορους μηχανισμούς όπως η κυτταρική νέκρωση, τα αποπτωτικά κύτταρα που δεν απομακρύνονται από φαγοκύτταρα και το οξειδωτικό στρες.

Η ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων ως απόκριση στα FFA, το οξειδωτικό στρες και σε άλλους προ-φλεγμονώδης μεταβολίτες που παρατηρείται στο NAFLD, με επακόλουθη παραγωγή ιντερλευκίνης 1β (interleukin 1β; IL-1β), θα μπορούσε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη NASH, μέσω καταστολής του υποδοχέα α ενεργοποιούμενο από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων (peroxisome proliferator-activated receptor α; PPAR-α) και προάγοντας έμμεσα τον κυτταρικό θάνατο μέσω του TNF-α. Στη NASH, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα ρυθμίζουν θετικά τα φλεγμονοσώματα, προκαλούν την απελευθέρωση σημάτων κινδύνου από τα ηπατοκύτταρα με κασπασοεξαρτούμενους μηχανισμούς και προάγουν την ευαισθητοποίηση στην απελευθέρωση IL-1β και λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide; LPS) στα ηπατοκύτταρα. Υποστηρικτικά σε αυτό, μοντέλα μυών με έλλειψη του φλεγμονοσώματος NLRP3 προστατεύονται από NASH προκαλούμενη μέσω διατροφής.

Σημαντικά στην ενεργότητα των φλεγμονοσωμάτων είναι τα κύτταρα Kupffer: εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα το mRNA της IL-1β και η μείωση τους οδηγεί σε ολική μείωση των επιπέδων IL-1β και μειωμένα επίπεδα αυτού στον ορό. Η ρύθμιση του φαινοτύπου των κυττάρων Kupffer θα μπορούσε να αποτελεί αντι-ινωτική θεραπευτική στρατηγική.

Κατά συνέπεια, έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με φλεγμονοσώματα (NLRP3, pro-IL-1β, pro-IL-18) είναι σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με αυτούς με απλή στεάτωση. [9]

1.4.2.7. Κυτταρικός θάνατος και επιδιόρθωση

Η ηπατοκυτταρική απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ηπατική βλάβη και την ανάπτυξη NASH. Ο διαλυτός Fas, ένας μεμβρανικός υποδοχέας θανάτου της οικογένειας των παραγόντων νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factors; TNF), φαίνεται να είναι σημείο-κλειδί της απόπτωσης. Η εισροή

FFA στα ηπατοκύτταρα προκαλεί αύξηση των προσδετών Fas και ενεργοποίηση των Fas υποδοχέων που οδηγούν σε απόπτωση. Επιπλέον, οι δραστικές κασπάσες (κυρίως η κασπάση 3) διασπούν διάφορα υποστρώματα μέσα στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένης της κυτοκερατίνης 18 (cytokeratin 18; CK-18), που είναι μια σημαντική ενδιάμεση πρωτεΐνη στο ήπαρ, και οδηγούν σε απόπτωση. Φράγματα της CK-18 μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα με ELISA και φαίνεται να μπορεί να αναδειχθεί σε ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο στο μέλλον.

Η σηματοδότηση Hedgehog (Hh) εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του ηπατικού ιστού και συνεπώς μελετάται στη NAFLD ώστε να διαπιστωθεί εάν η επιμήκυνση της σηματοδότησης αυτής μπορεί να επηρεάσει την έκβαση της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα της ενεργότητας του Hh φαίνεται να είναι ανάλογα της έκτασης και της βαρύτητας της ηπατικής βλάβης τόσο σε τρωκτικά όσο και στον άνθρωπο. Η μακροφαγική διήθηση έχει επίσης παρατηρηθεί σε ασθενείς με NASH, και η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 (monocyte chemoattractant protein 1; MCP-1) είναι επίσης σημαντικός παράγοντας στη NASH που μπορεί να ρυθμίζει την εξέλιξη της νόσου προκαλώντας χρόνια φλεγμονή ως αποτέλεσμα της διήθησης λευκοκυττάρων στο ήπαρ. [13]

1.4.3. Γενετικοί παράγοντες

Γενετικοί παράγοντες, κυρίως με τη μορφή πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου, επηρεάζουν τη ροή FFA, το οξειδωτικό στρες, την αντίδραση σε ενδοτοξίνες και την παραγωγή και ενεργότητα κυτοκινών, και είναι παράγοντες ανάπτυξης και εξέλιξης της NAFLD.

Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος έχουν εξακριβώσει το ρόλο των πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου της patatin-like φωσφολιπάσης 3 (patatin-like phospholipase 3, PNPLA3) στην ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD και πιο συγκεκριμένα του πολυμορφισμού I 148 M (rs738409 C/G). Αυτή η μονή μεταλλαγή αντικαθιστά την κυτοσίνη με γουανίνη που αλλάζει το κωδικόνιο 148 από ισολευκίνη σε μεθειονίνη. Το γονίδιο *PNPLA3* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αδιπονουτρίνη, η οποία εμφανίζει σημαντική ομολογία με τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και μπορεί να προάγει λιπολυτική ενεργότητα στα τριγλυκερίδια. Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται κυρίως σε τμήματα της ενδοκυτταρικής μεμβράνης των ηπατοκυττάρων και η ενεργότητά της προάγεται μετά από κατανάλωση τροφής ή κατά την διάρκεια ανοχής στην ινσουλίνη. Το G αλληλόμορφο φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη εισροή τριγλυκεριδίων στο ήπαρ άρα και NAFLD. Ο φυσιολογικός φαινότυπος εκφράζεται από το CC αλληλόμορφο, ενώ στη NAFLD εμφανίζονται τα CG και GG αλληλόμορφα, με το τελευταίο να σχετίζεται με αυξημένη εξέλιξη της νόσου σε ίνωση και κίρρωση. [13] Το *PNPLA3 148M* αλληλόμορφο (CG) σχετίζεται με μειωμένη DNL και έκφραση του λιπογενικού παράγοντα SREBP1c, παρά τη φαινομενική αύξηση λιπιδικού φορτίου, ενώ αντίθετα η ηπατική β-οξείδωση δεν επηρεάζεται από αυτόν.

Επιπροσθέτως, η συσσώρευση λίπους στους φορείς *PNPLA3 148M* σχετίζεται με μειωμένη έκκριση λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια από το ήπαρ.[9]

Μετά την ανακάλυψη της συσχέτισης της μετάλλαξης του *PNPLA3* με την στεάτωση και την στεατοηπατίτιδα, πολλοί άλλοι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms; SNPs) έχουν βρεθεί σε ασθενείς με NAFLD/NASH. Μελέτες γονιδιώματος σε μη ισπανικής προέλευσης, καυκάσιες γυναίκες με διαγνωσμένη μέσω βιοψίας NAFLD, έδειξαν πως η μη αλκοολική στεάτωση σχετίζεται σημαντικά με τη μετάλλαξη rs264524 του χρωμοσώματος 8 στο γονίδιο της πρωτεΐνης FDFT-1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase-1), η οποία είναι κύριος ρυθμιστής της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Αυτή η πιλοτική μελέτη έδειξε επίσης πως ο βαθμός της ίνωσης συσχετίζεται ισχυρά με τον SNP rs343062 στο χρωμόσωμα 7, αν και η ακριβής λειτουργία αυτού είναι άγνωστη. Τρεις άλλοι SNPs έχουν σχετιστεί με το φαινότυπο της φλεγμονής στους ηπατικούς λοβούς: ο rs1227756 στο χρωμόσωμα 10 στο γονίδιο α1 του κολλαγόνου XIII (*COL13A1*), ο rs6591182 στο χρωμόσωμα 11, και ο rs887304 στο χρωμόσωμα 4 στο γονίδιο του τομέα πρόσδεσης ασβεστίου 4B (*EFCAB4B*). [13]

Ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο του μέλος 2 της διαμεμβρανικής υπερικογένειας 6 (transmembrane 6 superfamily member 2; TM6SF2) πιθανώς εμπλέκεται στην παθογένεση της NAFLD. Η TM6SF2 προκαλεί έκκριση VLDL, ενώ ο πολυμορφισμός rs58542926, μέσω απώλειας λειτουργίας, σχετίζεται με ηπατική στεάτωση, χαμηλότερα επίπεδα VLDL στο πλάσμα και υψηλότερα επίπεδα ATP. Παρά το γεγονός ότι οι φορείς αυτού του πολυμορφισμού εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης NASH, προστατεύονται από καρδιαγγειακές νόσους λόγω των χαμηλών επιπέδων VLDL. [9]

Άλλη σημαντική παραλλαγή γονιδίου που έχει μελετηθεί εκτενώς, είναι αυτή της ρυθμιστικής πρωτεΐνης της γλυκοκινάσης (glucokinase regulatory protein; GCKR). Η GCKR ρυθμίζει την γλυκοκινάση, ένα φωσφορυλιωτικό ένζυμο υπεύθυνο για τον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης και για την ενεργοποίηση της ηπατικής λιπογένεσης. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο, και συγκεκριμένα οι rs780094 και rs1260326, σχετίζονται με αυξημένο ρίσκο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2, ειδικά στους ασιατικούς πληθυσμούς. [13]

1.4.4. Επιγενετικοί παράγοντες

Κλινικές μελέτες που διερευνούν τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό στη NAFLD έρχονται σταδιακά στο προσκήνιο.

Οι επιγενετικές διαφοροποιήσεις είναι σταθερές αλλαγές σε μεταγραφικό επίπεδο, όπως μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ιστονών και δραστηριότητα των μικρο-RNAs (miRNAs), που δεν μεταβάλλουν τη βασική αλληλουχία του DNA και συμβάλλουν στην κυτταρική ομοίωση εμφανίζοντας υψηλό βαθμό

αναπτυξιακής και περιβαλλοντικής πλαστικότητας. Έχει υποθεθεί πως η κατανομή αυτής της ισορροπίας μπορεί να καθορίσει αυξημένη επιδεκτικότητα στη NAFLD. Σε μελέτη με μοντέλα μυών, στα οποία προκλήθηκε NASH μέσω διατροφής, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης NASH και επιγενετικών τροποποιήσεων και πιο συγκεκριμένα μεθυλίωσης κυτοσίνης.

Η μεθυλίωση του DNA θεωρείται σημαντικός παράγοντας που οδηγεί από απλή στεάτωση σε NASH και επηρεάζεται κυρίως από διαιτητικές ελλείψεις σε φορείς μεθυλίου, όπως βεταΐνης και χολίνης.

Τροποποιήσεις στην ακετυλίωση ιστονών, μέσω απακετυλασών των ιστονών (histone deacetylases; HDACs) και ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών (histone acetyltransferases; HATs), είναι το πιο μελετημένο είδος επιγενετικών τροποποιήσεων. Οι σιρτουίνες (Silent information regulator-2-family; SIRT6) είναι ομάδα πρωτεϊνών με δραστηριότητα αποακετυλίωσης, και ειδικά η SIRT1 σχετίζεται με ρύθμιση πρωτεϊνών της ομοιόστασης γλυκόζης, του οξειδωτικού στρες, του μεταβολισμού των λιπιδίων και της αντίδρασης φλεγμονής. Συσχέτιση μεταξύ του NAFLD και μειωμένη έκδρασης της SIRT1 έχει δείχθει τόσο σε μοντέλα ζώων όσο και στον άνθρωπο.

Σε μελέτη που συμπεριλάμβανε παχύσαρκους ασθενείς με όλα τα στάδια NAFLD καθώς και υγιείς μάρτυρες, διαφορές στην έκφραση και διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν σε εννέα γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα-κλειδιά του διάμεσου μεταβολισμού και του μονοπατιού σηματοδότησης της ινσουλίνης. Αυτές οι αλλαγές στη μεθυλίωση ήταν μερικώς αντιστρεπτές μετά από βariatρική επέμβαση.

Τέλος, έχει δειχθεί πως μη-κωδικά RNA ρυθμίζουν επιγενετικούς μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης. Οι μελέτες μη-κωδικών RNA στη NASH μέχρι στιγμής περιορίζονται στα miRNAs, μικρά ενδογενή μονόκλωνα μόρια RNA που ρυθμίζουν διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς επηρεάζοντας τη μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Μεταβολές στην έκφραση και στα επίπεδα έκφρασης miRNAs έχουν συνδεθεί με την παθογένεση των NAFLD/NASH. Εξ αυτών, το miR-122, το πιο άφθονο miRNA στο συκώτι, έχει δειχθεί σε μοντέλα ζώων πως αν ανασταλεί η λειτουργία του οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα και διαφορετική έκφραση ηπατικών γονιδίων που σχετίζονται με τη χοληστερόλη και το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Μελέτη σε ανθρώπους έδειξε πως 113 miRNAs εκφράζονται διαφορετικά στον κοιλιακό λιπώδη ιστό ασθενών με NASH σε σύγκριση με ασθενείς με απλή στεάτωση: από αυτά, 7 σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με την παρουσία NASH και εμπλέκονται στην ρύθμιση γονιδίων των μεταβολικών μονοπατιών, ενώ δύο (miR-97, miR-99) συσχετίζονται με την παρουσία και την έκταση ηπατικής ίνωσης. [9]

1.4.5. Διαιτητικοί παράγοντες

Διαιτητικοί παράγοντες, τόσο με την έννοια της ποσότητας και της θερμιδικής κατανάλωσης όσο και με την έννοια συγκεκριμένων συστατικών, σχετίζονται με την ανάπτυξη NAFLD και NASH. Σε έρευνα 18 υγιών ατόμων, ο διπλασιασμός της συνήθους θερμιδικής κατανάλωσης με γεύματα fast-food οδήγησε σε αύξηση της ALT του ορού και εμφάνιση στεάτωσης σε λιγότερο από 4 εβδομάδες.

Η φρουκτόζη είναι λιπογενικός, προ-φλεγμονώδης διαιτητικός παράγοντας και προκαλεί οξειδωτικό στρες και αύξηση της έκφρασης του TNFα. Καθαρίζεται από το συκώτι κατά 90% και μεταβολίζεται από συγκεκριμένες ηπατικές κινάσες, ανεξάρτητα από τη δράση της ινσουλίνης, σε 1-φωσφορική φρουκτόζη. Αυτή μετατρέπεται σε φωσφορική τριόζη και εισέρχεται στο μονοπάτι της γλυκόζης παράγοντας υποστρώματα για DNL. Σε μοντέλα μυών, η NAFLD προκαλούμενη από φρουκτόζη σχετίζεται με αύξηση των βακτηρίων και αυξημένη εντερική διαπερατότητα. Σε ασθενείς με NAFLD, η καθημερινή πρόσληψη φρουκτόζης σχετίζεται με αύξηση της ίνωσης και έχει προταθεί πως αυτό οφείλεται σε φρουκτόζη βιομηχανικής και όχι φυσικής προέλευσης.

Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τυπικά της μεσογειακής διατροφής, είναι προστατευτικά έναντι της NAFLD. Έχει επίσης προταθεί πως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να είναι προστατευτική σε μια ιαπωνική έρευνα 5000 ατόμων. Σε μια μετα-ανάλυση πάνω από 40000 ατόμων, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ συσχετίστηκε με μείωση της εμφάνισης NAFLD στο γενικό πληθυσμό και NASH σε ασθενείς με NAFLD. [9]

1.4.5.1. Επιρροή της μικροχλωρίδας: ο άξονας εντέρου-ήπατος

Αναγνωρίζεται διαρκώς πως η μικροχλωρίδα του εντέρου εμπλέκεται στην παθογένεση και την εξέλιξη της NAFLD, μέσω του επανομαζόμενου άξονα εντέρου-ήπατος.

Λαμβάνοντας πάνω από το 50% του αίματος που απαιτεί από τη σπλαχνική περιοχή, το ήπαρ είναι ένα από τα πιο εκτεθειμένα όργανα στις τοξίνες που προέρχονται από το έντερο και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των προϊόντων βακτηρίων. Η επικοινωνία μεταξύ ξενιστή και μικροχλωρίδας στην επιφάνεια του εντέρου είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη και την ομοίωση του επίκτητου και προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Ο λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide; LPS) είναι ένα από τα κυριότερα τοξικά παράγωγα βακτηρίων και μπορεί να δράσει, συνδεδεμένο με τον συν-υποδοχέα CD14, ως προσδέτης για TLR με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη της φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών των κινάσων που ενεργοποιούνται από στρες, της JNK, του παράγοντα ρύθμισης ινσουλίνης 3 και του μεταγραφικού παράγοντα β . Αυτά τα μονοπάτια εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανοχής στην ινσουλίνη, στην παχυσαρκία, στη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ και στην ανάπτυξη και εξέλιξη της NASH. συγκεκριμένα μοτίβα ποικιλίας μικροχλωρίδας μπορούν να αυξήσουν την εντερική διαπερατότητα και να προκαλέσουν λιποπολυσακχαριδαίμια. Ασθενείς με

NAFLD έχουν αυξημένη εντερική διαπερατότητα και υψηλότερη παρουσία και αύξηση βακτηριακής μικροχλωρίδας σε σχέση με υγιείς. Η υψηλή συσχέτιση βακτηριακής αύξησης και NASH παρατηρείται ακόμα και απουσία αυξημένης εντερικής διαπερατότητας.

Η εντερική μικροχλωρίδα επηρεάζει την ενεργειακή ισορροπία του ξενιστή ζυμώνοντας ανθεκτικούς αμυλώδεις και μη-αμυλώδεις πολυσακχαρίτες σε λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (short-chain fatty acids; SCFA) και κάνοντας τα απορροφήσιμα από το εντερικό επιθήλιο. Επιπροσθέτως, τα βακτήρια καταστέλλουν τη σύνθεση του παράγοντα λιποκυττάρων που προάγεται από νηστεία (fasting-induced adipocyte factor; Fiaf) οδηγώντας σε αυξημένη ενεργότητα λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και αυξημένη συσσώρευση τριγλυκεριδίων. Μπορεί επίσης παράγει ένζυμα που καταλύουν την μετατροπή της διατροφικής χολίνης σε τοξικά προϊόντα (κυρίως μεθυλαμίνες). Αυτές οι αμίνες μπορούν να προσληφθούν από το συκώτι, να μετατραπούν σε τριμεθυλαμίνες-N-οξείδια και να προκαλέσουν φλεγμονή και ηπατική βλάβη. Όπως έδειξε πρόσφατη έρευνα, η δυσβίωση με τη μικροχλωρίδα μπορεί να προκαλέσει NASH είτε μειώνοντας τα επίπεδα της χολίνης είτε αυξάνοντας τα επίπεδα μεθυλαμίνης. Άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου προκαλείται NAFLD είναι με αλλαγή στο μεταβολισμό του χολικού οξέος, επηρεάζοντας λειτουργίες όπως η ηπατική DNL και η έκκριση VLDL.

Η εντερική μικροχλωρίδα είναι επίσης σημαντική πηγή ενδογενούς παραγωγής αλκοόλης και σχετιζόμενες με την παχυσαρκία ανωμαλίες σχετίζονται με την αυξημένα επίπεδα αλκοόλης αναπνοής. Έρευνα που στόχευε στην αναγνώριση πιθανών διαφορών στην εντερική μικροχλωρίδα ασθενών με NASH, παχύσαρκων και υγιών παιδιών, έδειξε αφθονία βακτηρίων που παράγουν αλκοόλη στη NASH με επακόλουθη αύξηση της αιθανόλης στο αίμα. Αυτή η υπόθεση μπορεί να εξηγήσει την ομοιότητα μεταξύ ιστολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών που υπάρχει μεταξύ αλκοολικής και μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος.

Τέλος, βλάβες στο φλεγμονόσωμα NALP3 σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα IL-18 και άλλων κυτοκινών στο έντερο, οδηγώντας στη ρύθμιση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη εισροή ανταγωνιστών των TLR4 και TLR5 στην πυλαία κυκλοφορία και κατά συνέπεια πιο οξύ NASH. [9]

1.5. Διάγνωση

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι κατά βάση μη-συμπτωματική ασθένεια και η διάγνωσή της γίνεται συχνά τυχαία. Οι κλινικοί ιατροί θα πρέπει να εξετάζουν τη πιθανότητα ύπαρξης της νόσου σε ασθενείς με μη κανονικούς ηπατικούς δείκτες και με ταυτόχρονη παρουσία ενός ή παραπάνω μεταβολικών παραγόντων επικινδυνότητας: η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται αναλογικά με τον αριθμό παραγόντων του μεταβολικού συνδρόμου που υπάρχουν. Παρόλο που τα επίπεδα ασπαρατικής τρανσαμινάσης (aspartate transaminase; AST) και τρανσαμινάσης της αλανίνης (alanine

transaminase; ALT) διαφοροποιούνται στους ασθενείς με NAFLD, μπορεί να θεωρούνται και φυσιολογικά ανάλογα με το κατώφλι που χρησιμοποιείται. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως η ALT δεν είναι καλός βιοδείκτης για την πρόβλεψη ίνωσης στους ασθενείς με NAFLD.

Το υπερηχογράφημα αποτελεί καλό διαγνωστικό εργαλείο για περιπτώσεις με τουλάχιστον 30% ηπατική στεάτωση με 64% ευαισθησία και 85% ειδικότητα, παράγοντες που βελτιώνονται συνεχώς. Άλλα μέσα για τη διάγνωση ηπατικής στεάτωσης αποτελούν η παράμετρος ελεγχόμενης εξασθένησης (Control Attenuation Parameter; CAP, λογισμικό του συστήματος Fibroscan) και η σπεκτροσκοπία μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Spectroscopy; MRS), τα οποία είναι πιο ευαίσθητα και προσφέρουν ποσοτική ανάλυση της ηπατικής κατάστασης.

Για την μη επεμβατική διάγνωση της νόσου υπάρχουν διάφορα συστήματα βαθμολόγησης και βοηθούν στην κατάταξη ασθενών με μικρή ή σημαντική ηπατική ίνωση. Μεταβλητές σε πολλά από αυτά αποτελούν το εύρος της AST και της ALT, η ηλικία και η μειωμένη ανοχή στην γλυκόζη. Άλλες τέτοιες δοκιμασίες αποτελούν ο Ευρωπαϊκός Πίνακας Ηπατικής Ίνωσης, που συνδυάζει τρεις παράγοντες βιοδεικτών του ορού του αίματος (υαλουρονικό οξύ, πεπτιδίο του προ-κολλαγόνου-III και ιστοειδικός αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης 3), και το FibroTest. Η παροδική ελαστογραφία, όπως το Fibroscan, έχουν δοκιμαστεί για τη διάγνωση του NAFLD και συνήθως χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά στις μη επεμβατικές δοκιμασίες. Μέχρι σήμερα ωστόσο, η βιοψία ήπατος αποτελεί το πιο αξιόπιστο και διαδεδомένο μέσο για τη διάγνωση και εκτίμηση του βαθμού NAFLD/NASH και είναι το πρωτεύον τελικό σημείο για τα τελικά στάδια των κλινικών δοκιμών. [24]

1.6. Θεραπεία

1.6.1. Απώλεια βάρους

Η παρέμβαση στον τρόπο ζωής και στις διαιτητικές συνήθειες, αποτελεί ακόμα τον κύριο τρόπο διαχείρισης θεραπείας της NAFLD, καθώς δεν υπάρχουν εγκεκριμένοι θεραπευτικοί παράγοντες. Παρόλο που η αλλαγή στον τρόπο ζωής είναι αποτελεσματική μπορεί να είναι δύσκολη στην υλοποίηση της, και συνεπώς ο στόχος πρέπει να είναι η σταδιακή αλλά σταθερή απώλεια βάρους σε περίοδο 6-12 μηνών. Συνήθως προτείνεται οι ασθενείς να περιορίσουν την πρόσληψη θερμίδων σε 500-1000 kcal την ημέρα και να παρακολουθούνται σταθερά από κλινικό διαιτολόγο. Απλοί υδατάνθρακες στη διατροφή, όπως η φρουκτόζη, έχουν συνδεθεί με τη NAFLD. Η κατανάλωση υδατανθράκων επηρεάζει την ομοιόσταση της γλυκόζης και το μεταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ, και κατά συνέπεια η επίδραση δίαιτας με μειωμένους υδατάνθρακες έχει μελετηθεί εκτενώς. Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως η μείωση του σωματικού βάρους 7-10% σχετίζεται με μείωση της φλεγμονής στο ήπαρ, και συνεπώς αυτό το ποσοστό έχει τεθεί ως στόχος στους ασθενείς. Ενώ η άσκηση από μόνης της δεν έχει αποδειχθεί να είναι

αποτελεσματική, σε συνδυασμό με την αλλαγή των διαιτητικών συνήθειων προτείνεται ελαφριά άσκηση, όπως περπάτημα, για 30-45 λεπτά την ημέρα, το οποίο έχειδειχθεί ότι βελτιώνει ιστολογικούς και βιοχημικούς παράγοντες της NAFLD.

Απώλεια βάρους μπορεί να επιτευχθεί και με χρήση φαρμακολογικών παραγόντων. Το Orlistat οδηγεί σε μέτρια απώλεια βάρους μειώνοντας την απορρόφηση λίπους 30% μέσω αναστολής των γαστρικών και παγκρεατικών λιπασών. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως τα αποτελέσματα της χορήγησης του Orlistat είναι μέτρια και περιορίζονται μόνο στους ασθενείς στους οποίους επιτεύχθηκε 9% απώλεια βάρους μέσω διαχείρισης του τρόπου ζωής. Το Sibutramine είναι αναστολέας της σεροτονίνης και της νορανδρεναλίνης που αυξάνει το αίσθημα κορεσμού και μπορεί να οδηγήσει σε μέτρια απώλεια βάρους. Σε μελέτη στην οποία έγινε χορήγηση του Sibutramine για περίοδο 6 μηνών σε ασθενείς με NASH, κατάφερε να μειώσει το βάρος των ασθενών κατά 10%, να βελτιώσει την ανοχή στην ινσουλίνη και μειώσει τα επίπεδα των τρανσαμινασών. Παρόλα αυτά η χρήση της αποσύρθηκε λόγω της επικινδυνότητας θανάτου λόγω καρδιακών παθήσεων. Τέλος, το Rimonabant είναι ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα κανναβινοειδών που αποτέλεσε πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό παράγοντας καθώς όχι μόνο οδήγησε σε απώλεια βάρους, αλλά και σε βελτίωση της ανοχής της ινσουλίνης και των επιπέδων λιπιδίων και αδιπνονεκτίνης στον ορό. Αποσύρθηκε ωστόσο από την αγορά το 2008 λόγω σοβαρών ψυχιατρικών παρενεργειών. [25]

Η βαριατρική επέμβαση, που είναι συνήθης τακτική για απώλεια βάρους, μειώνει τα περισσότερα από τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του NAFLD καθώς και τον σχετιζόμενο με την παχυσαρκία διαβήτη τύπου II και την ανοχή στην ινσουλίνη. Το NAFLD μόνο δεν αποτελεί προς το παρόν ένδειξη για ανάγκη βαριατρικής επέμβασης. Η επέμβαση αυτή αυξάνει την ευαισθησία σε ινσουλίνη στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό λόγω της απώλειας βάρους, και συνεπώς βελτιώνει την μεταβολική υγεία στο σύνολο της. Παραμένει άγνωστος ο μηχανισμός βελτίωσης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. [26]

1.6.2. Φαρμακολογικοί παράγοντες

1.6.2.1. Παράγοντες ευαισθητοποίησης ινσουλίνης

Δεδομένης της επίδρασης της ανοχής στην ινσουλίνη στην παθογένεση της NAFLD, παράγοντες ευαισθητοποίησης στην ινσουλίνη, όπως το metformin και το thiazolidinedione (TZDs) έχουν μελετηθεί εκτενώς για την θεραπεία της νόσου. [27]

- *Metformin*

Το metformin είναι ένας παράγοντας ευαισθητοποίησης στην ινσουλίνη που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II, και η δράση του γίνεται κυρίως μέσω ενεργοποίησης του AMPK. Βελτιώνει την περιφερική πρόσληψη γλυκόζης, μειώνει την ηπατική

γλυκονεογένεση και λιπογένεση, και αυξάνει την β οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Κλινικές μελέτες στο NAFLD έχουν δείξει την σταθερή ευεργετική του επίδραση και συνεπώς η χρήση του περιορίζεται τελευταία κυρίως για περιστατικά NAFLD με υποκείμενο διαβήτη τύπου II.

- *Thiazolidinediones (TZDs)*

Οι TZDs είναι ανταγωνιστές του PPAR-γ και οι επίδραση τους στη NAFLD είναι έμμεσες και σε μεγάλο βαθμό σχετίζονται με τα δράση τους στο λιπώδη ιστό. Επιπροσθέτως, οι TZDs αυξάνουν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης ή/και της σιτρολίνης στα ηπατοκύτταρα, που ρυθμίζουν κεντρικούς ηπατικούς μεταβολικούς ρυθμιστές, όπως οι AMPK, Foxo1, LKB1, NAD, NADH, PGC-1α και PPAR-1α. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη οξείδωση λιπαρών οξέων και κατά συνέπεια οδηγεί στην μείωση της εισροής λίπους στο ήπαρ. Οι παράγοντες αυτοί έχουν δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα σε προ-κλινικά μοντέλα της NAFLD. Ωστόσο η χρήση τους περιορίζεται λόγω της επίδραση τους στη μείωση της νεφρικής απέκκρισης νατρίου και στη εντερική ιοντική μεταφορά, το οποίο οδηγεί σε αυξημένη κατακράτηση όγκου/υγρών στο πλάσμα και σε παροξύνσεις προϋπάρχοντων καρδιακών ανεπαρειών. Οι TZDs μειώνουν επίσης την ηπατική στεάτωση και βελτιώνουν την ανοχή στην ινσουλίνη στο ήπαρ και στους μύες. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της ευαισθησίας των λιποκυτάρων στην ινσουλίνη, και μεταφοράς του εκτοπικού λίπους του ήπατος και των μυών στον υποκείμενο λιπώδη ιστό.

- *Θεραπείες βασιζόμενες στις ινκρετίνες*

Οι ινκρετίνες είναι νευροενδοκρινής ορμόνες προερχόμενες από το έντερο, παράγονται από τον εντερικό σωλήνα ως απόκριση στην κατανάλωση φαγητού και διεγείρουν την εξαρτώμενη από γλυκόζη απελευθέρωση ινσουλίνης, μειώνουν την απελευθέρωση γλυκαγόνου και παρατείνουν τη γαστρική κένωση. Συνεπώς, αυτά τα φάρμακα έχουν εγκριθεί για τη διαχείριση του διαβήτη τύπου II, όπου βελτιώνουν τον γλυκαιμικό έλεγχο και οδηγούν σε σημαντική απώλεια βάρους. Η χρήση των ινκρετινών στη διαχείριση του NAFLD είναι πολλά υποσχόμενη και πολλές κλινικές μελέτες λαμβάνουν χώρα ακόμα.

- *Φαρμακολογικοί παράγοντες για τη μείωση των λιπιδίων*

Οι στατίνες, οι ινωτίνες και τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία δυσλιπιδαιμιών, που είναι συχνές σε ασθενείς με NAFLD. Προς το παρόν δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να υποστηρίζουν την άμεση ευεργετική χρήση τους στη NAFLD αλλά είναι σημαντικοί παράγοντες για τη μείωση της συνεπαγόμενης επικινδυνότητας καρδιαγγειακών παθήσεων.

1.6.2.2. Υπέρταση

Οι αποκλειστές των υποδοχέων της αγγιοτενσίνης II (angiotensin II receptor blockers; AII RB) αναστέλλουν την διαφοροποίηση των αστεροειδών κυττάρων μειώνοντας τη φλεγμονή και την ίνωση. Παρόλο που αρχικές κλινικές μελέτες έδειξαν βελτίωση στα επίπεδα τρανσαμινασών και στην ιστολογική εικόνα ασθενών με NASH, μεγαλύτερες μελέτες δεν οδήγησαν σε παρόμοια αποτελέσματα. [27]

1.6.2.3. Αντιοξειδωτικές και κυτταροπροστατευτικές θεραπείες

- *Βιταμίνη E*

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή πρωτεΐνη με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Δύο πρόσφατες μεγάλες τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες, PIVENS και TONIC, εκτίμησαν τα αποτελέσματα της χορήγησης της σε παιδιά και ενήλικες με NAFLD αντίστοιχα. Και οι δύο μελέτες έφτασαν στον πρωτεύον τελικό σημείο, αλλά παραμένουν ανησυχίες όσον αφορά την μακροχρόνια ασφάλεια των ασθενών για την υψηλή δόση που χορηγήθηκε, καθώς έχει δείχθει πως αυξάνει στην θνησιμότητα από κάθε αίτιο.

- *Βεταΐνη*

Η βεταΐνη είναι φυσικός μεταβολίτης της χολίνης και έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα της S-αδενοσυλμεθειονίνης και μειώνει το οξειδωτικό στρες. Δυστυχώς, συγκρινόμενη με εικονικό φάρμακο σε κλινική τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη, απέτυχε να βελτιώσει τη στεάτωση ή άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά της NAFLD.

- *Ουρσοδεοξυχολικό οξύ (Ursodeoxycholic acid; UDCA)*

Το UDCA είναι υδρόφιλο χολικό οξύ με κυτταροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Δύο καλά σχεδιασμένες κλινικές τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν ιστολογικές και βιοχημικές βελτιώσεις σε ασθενείς με NASH διαγνωσμένο μέσω βιοψίας.

- *Πεντοξυφυλλίνη (Pentoxifylline)*

Η πετοξυφυλλίνη είναι αναστολέας του TNFα που έχει αξιολογηθεί στη NASH για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένης, διπλά τυφλής, ελεγχόμενης από εικονικό φάρμακο κλινικής μελέτης, έδειξε πως η πεντοξυφυλλίνη μπορεί να μειώσει την ενεργότητα των αμινοτρανσφερασών και να βελτιώσει ιστολογικές παραμέτρους σε ασθενείς με NAFLD, αλλά τα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογηθούν σε μεγαλύτερες κλινικές μελέτες.

1.6.2.4. Φυσιολογική μικροχλωρίδα

Τα προβιοτικά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της πιθανής τους ιδιότητας να μεταβάλλουν τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας άρα και την αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος με το εντερικό επιθήλιο. Τα εμπορικά προβιοτικά συνήθως περιλαμβάνουν βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Clostridium/Bacillus*), gram θετικά βακτήρια (*Actinomycetes, Bifidobacteria*) και

βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια (*Clostridium*). Πολλά από αυτά, ειδικά τα είδη του λακτοβάκιλλου, παράγουν γαλακτικό οξύ και είναι οξεόφιλα, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν περισσότερο στο στομάχι και να προστατεύονται από τους γαστρικούς μη-ανοσοποιητικούς φραγμούς. Πρόσφατη μετα-ανάλυση 14 τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών μελετών από συνολικά 134 ασθενείς με NAFLD/NASH έδειξε πως η θεραπεία με προβιοτικά μείωσε τις ηπατικές αμινοτρανσφεράσες, τα ολικά επίπεδα χοληστερόλης και TNFα, και να βελτιώσει την ανοχή στην ινσουλίνη. Ωστόσο δεν έδειξε μεταβολές στα επίπεδα γλυκόζης και LDL. Περισσότερα δεδομένα που να περιλαμβάνουν και ιστολογικά χαρακτηριστικά είναι αναγκαία όσον αφορά τη χρήση προβιοτικών. [27]

1.6.2.5. Μεταμόσχευση ήπατος

Για τους ασθενείς με τελικό στάδιο ηπατικής νόσο λόγω NAFLD η μεταμόσχευση ήπατος είναι η μόνη εναλλακτική. Ωστόσο η επανεμφάνιση NASH είναι συχνό φαινόμενο λόγω της διατήρησης των μεταβολικών παραγόντων επικινδυνότητας, αλλά και λόγω χρήσης ανοσοκατασταλτικών, όπως τα κορτικοστεροειδή, μετά τη μεταμόσχευση. [27]

1.7. State-of-the-art: ερευνητικές στρατηγικές για τη μελέτη της Μη Αλκοολικής Λιπώδης Νόσου του Ήπατος

1.7.1. Ελεύθερα λιπαρά οξέα της διατροφής

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ανάμεσα από τους πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με την παθογένεση της NAFLD, ο πιο άμεσος είναι ο ρόλος των ελεύθερων λιπαρών οξέων (free fatty acids; FFA). Αυτό έχει αποδειχθεί *in vivo* από τη στενή σχέση των λιποκυττάρων, που μεταφέρουν FFA, και κυττάρων-στόχων, όπως τα ηπατοκύτταρα. [28]

Οι πηγές ελεύθερων λιπαρών οξέων είναι:

- 1) Λιπαρά οξέα της διατροφής, κυρίως μέσω πρόσληψης χυλομικρών από το έντερο
- 2) Αυξημένη λιπόλυση του περιφερικού λίπους που βρίσκεται αποθηκευμένο στο λευκό λιπώδη ιστό, ο οποίος ρέει στο ήπαρ μέσω του πλάσματος ως μη-εστεροποιημένα λιπαρά οξέα
- 3) Νέο-συντιθέμενα λιπαρά οξέα στο ήπαρ μέσω *de novo* λιπογένεσης [28]

Ο πιο άμεσος τρόπος για την ανάλυση της επίδρασης των FFA στο ηπατοκύτταρο είναι με έκθεση αυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις FFA, που θα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων που σχετίζεται με αλλαγές στην οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου. Ηπατοκύτταρα εκτεθειμένα σε 0,1% τριγλυκεριδίων έδειξαν αύξηση των επιπέδων παραγωγής ενδοκυτταρικών ROS, γεγονός που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και απόπτωση (λιπο-απόπτωση). Η χρήση ειδικού αναστολέα

φλαβοπρωτεϊνών, όπως η οξειδάση και η ρεντουκτάση του NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), άμβλυνε την αύξηση των ROS, υποδειλώνοντας πως αυτή εξαρτάται από της φλαβοπρωτεΐνες και προέρχεται από το μιτοχονδριακό σύμπλοκο I ή από την οξειδάση του NADPH.). [29]

Πέρα από το οξειδωτικό στρες η κυτταροτοξικότητα λόγω FFA επέρχεται μέσω κασπασο-εξαρτώμενης απόπτωσης, και η JNK πυροδοτεί το μονοπάτι μιτοχονδριακής απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του εξαρτώμενου από το Bim Bax. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως έχουν προταθεί στοιχεία ότι η χρήση ακόρεστων λιπαρών οξέων μπορεί να μιμηθεί την «υπόθεση δύο χτυπημάτων» *in vitro*. Έκθεση ηπατοκυττάρων σε FFA τα έκανε πιο ευάλωτα στην απόπτωση μέσω χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκοχενοδεοξυχολικού οξέος, ενώ μη –στεατοτικά κύτταρα δεν επηρεάστηκαν. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με σημαντικά επίπεδα μεταγραφής των προ-φλεγμονόδων κυτοκινών IL-8 και IL-22 μόνο στα στεατοτικά κύτταρα. [30]

Το ολεϊκό οξύ είναι μονοακόρεστο λιπαρό οξύ και είναι ένα από τα πιο κοινά λιπαρά οξέα στην διατροφή του ανθρώπου. Είναι απαραίτητο για το σχηματισμό της πλασματικής μεμβράνης και λειτουργεί ως πηγή ενέργειας. Αντίστοιχα, το παλμιτικό οξύ είναι κορεσμένο λιπαρό οξύ με τις ίδιες λειτουργίες και το πιο επικρατές στα στεατοτικά ηπατοκύτταρα. Η επίδραση των FFA διαφέρει ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο λιπαρό οξύ, με τη σειρά πιθανότητας πρόκλησης απόπτωσης είναι: στεαϊκό > παλμιτικό > πλαμιτολεϊκό > ολεϊκό. Σε συμφωνία με αυτήν την παρατήρηση έχει διαπιστωθεί διαφορική επίδραση του ολεϊκού και του παλμιτικού οξέος στην κυτταρική βιωσιμότητα, την ενεργοποίηση των κασπασών και την θραύση του DNA στα ηπατοκύτταρα. Αυτή η παρατήρηση υπογραμμίζει τη σημαντικότητα του λόγου κορεσμένων-ακόρεστων λιπαρών οξέων στην προετοιμασία των πειραματικών συνθηκών. [31]

Επιπροσθέτως πρέπει να ληφθεί υπόψιν πως τα διάφορα λιπαρά οξέα προσδένονται διαφορετικά στην κυτταρική μεμβράνη και προσλαμβάνονται διαφορετικά από το κύτταρο. Σε υψηλές συγκεντρώσει η μεταφορά μέσω διάχυσης είναι ο πιο σημαντικός μηχανισμός, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις λαμβάνει χώρα υποβοηθούμενη μεταφορά. Λόγω της λιποφιλικότητας τους, τα λιπαρά οξέα προσδένονται με την αλβουμίνη του ορού και μόνο τα ελεύθερα μη προσδεδεμένα λιπαρά οξέα μπορούν να εισέλθουν το κύτταρο. Οι κύριοι μεταφορείς της πλασματικής μεμβράνης είναι ο CD36/τρανσλοκάση των λιπαρών οξέων, η πρωτεΐνη μεταφοράς λιπαρών οξέων και οι καβεολίνες. Από τη στιγμή που διαφορές στην πρόσδεση έχουν παρατηρηθεί στον άνθρωπο αλλά και σε τρωκτικά, η πηγή της αλβουμίνης και το είδος λιπαρών οξέων είναι σημαντικές συνιστώσες στην *in vitro* μελέτη. Ικανό παράδειγμα είναι η παρατήρηση πως η πρόσδεση του ολεϊκού στην ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού είναι παρόμοια με την πρόσδεση του

παλμιτικού στην αλβουμίνη του ορού βοός, και αντίστροφα. Για άλλα λιπαρά οξέα, οι συντελεστές συσχέτισης διαφέρουν ανάλογα με τη θέση πρόσδεσης στην αλβουμίνη. Αυτά τα αποτελέσματα συνολικά υπογραμμίζουν την ανάγκη προσεκτικού υπολογισμού της συγκέντρωσης αλβουμίνης, της μοριακότητας του προσδέτη (FFA) και του λόγου αλβουμίνης/FFA σε κάθε πειραματική συνθήκη. [28]

1.7.2. Εξωγενής χορήγηση στεατογενικών φαρμακευτικών ουσιών

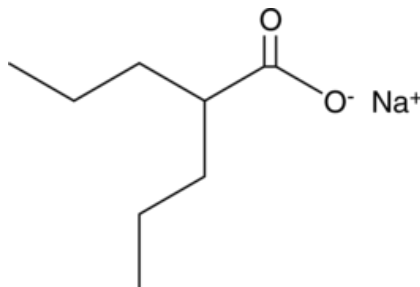
Πολλά φάρμακα προκαλούν στεάτωση ή στεατοηπατίτιδα με παθολογικά χαρακτηριστικά όμοια με την μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Η στεάτωση που προκαλείται από φάρμακα μπορεί να κατηγοριοποιηθεί περαιτέρω βάσει του επικρατέστερου χαρακτηριστικού στεάτωση που προκαλούν:

- 1) Μακροφουσαλιδώδης στεάτωση: περιγράφεται ως η παρουσία μικρών ή μεγάλων σταγονιδίων λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων με περιφερική μετατόπιση του πυρήνα. Αυτή η μορφή ηπατικής βλάβης είναι συνήθως αντιστρεπτή αλλά με το χρόνο μπορεί να εξελιχθεί σε στεατοηπατίτιδα και κύρωση. Γενικά σχετίζεται με αυξημένη έκθεση των ηπατοκυττάρων σε αλκοόλ, με τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, την ολική παρεντερική διατροφή, τη μεθοπρεξάτη (methotrexate; MTX) και το amiodarone (AMI). Αυτό το είδος στεάτωσης προκαλείται και από χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως το tamoxifen (TMX), το irinotecan (IRI) και η ασπαραγινάση.
- 2) Στεατοηπατίτιδα: χαρακτηρίζεται από στεάτωση, νεκροφλεγμονή, ηπατοκυτταρικό «φούσκωμα» με ή χωρίς υαλώδη σώματα Mallory, και σε μερικές περιπτώσεις ίνωση. Φάρμακα που σχετίζονται με στεατοηπατίτιδα είναι τα amiodarone, tamoxifen, methotrexate και irinocetan.
- 3) Μικροφουσαλιδώδης στεάτωση: εμφανίζεται ως συσσώρευση πολυάριθμων μικρών σταγονιδίων λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, χωρίς περιφερειακή μετατόπιση του πυρήνα. Αυτή είναι πιο σοβαρή μορφή ηπατικής βλάβης με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, και όταν είναι εκτενής ή μεγάλης διάρκειας μπορεί να είναι θανατηφόρα. Φάρμακα που σχετίζονται με αυτήν είναι στο βαλπροϊκό οξύ, οι τετρακυκλίνες, η ασπιρίνη, τα γλυκοκορτικοειδή και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. [32]

1.7.2.1. Βαλπροϊκό οξύ (Valproic acid; VPA)

Το βαλπροϊκό οξύ (Valproic Acid; VPA) και το νιτρικό του παράγωγο (sodium valproate) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιεπιληπτικό φάρμακο και είναι χημικό ανάλογο του λινολεϊκού οξέος. Υπολογίζεται πως χορηγείται σε πάνω από ένα εκατομμύριο ασθενείς παγκοσμίως κάθε μέρα. Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ως αναστολέας της δεακετυλάσης των ιστονών. Είναι αποτελεσματικό έναντι πολλών τύπων διαταραχών επιληπτικών κρίσεων, είτε μόνο του είτε ως μέρος ευρύτερης θεραπείας,

συμπεριλαμβανομένων περιπτώσεων διπολικής διαταραχής. Η αντισπασμωδική του ιδιότητα ανακαλύφθηκε το 1963 και εμπορευματοποιήθηκε το 1996 στη Γαλλία και το 1978 στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το VPA έχει ένα ευρύ φάσμα δράσης έναντι γενικών και μερικών επιληψιών τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες και γενικά θεωρείται ως η πρώτη επιλογή έναντι νέο-διαγνωσμένων επιληψιών. Πρόσφατα άρχισε να χρησιμοποιείται και για άλλα ιατρικά περιστατικά, όπως νευροπαθείς πόνοι, ημικρανίες και πονοκέφαλοι, καθώς και ως σταθεροποιητής της διάθεσης για διάφορες ψυχιατρικές παθήσεις. Σπάνια χρησιμοποιείται σε ασθενείς με άνοια ή στη θεραπεία της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας.



Το 1978, διάφορες κλινικές μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη βιοχημικών ανωμαλιών που σχετίζονται με το VPA στο ήπαρ. Ηπατοτοξικότητα σχετιζόμενη με το VPA μπορεί να εκδηλωθεί με έναν από τους ακόλουθους τρόπους, οι παθολογικοί μηχανισμοί των οποίων δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί:

1. Υπεραμμωναιμία: μπορεί να παρατηρηθεί ως μεμονωμένο βιοχημικό εύρημα με μια απλή γενική εξέταση αίματος. Μπορεί να είναι μια συμπτωματική πάθηση με αυξανόμενη απώλεια συνείδησης και προσανατολισμού που συνήθως ακολουθείται από γαστρεντερικά συμπτώματα όπως ναυτία, εμετός, ανορεξία και διάρροια. Τα συμπτώματα αυτά εξαφανίζονται περίπου τρεις μέρες μετά τη διακοπή χορήγησης του φαρμάκου.
2. Σύνδρομο που μοιάζει με ηπατίτιδα: χαρακτηρίζεται από δόσοεξαρτώμενη αύξηση των αμινοτρανφερασών του ορού. Η πλειοψηφία των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί, αν και μερικοί μπορεί να αναπτύξουν συμπτώματα ανορεξίας και λήθαργου. Οι βιοχημικές ανωμαλίες και τα κλινικά συμπτώματα συνήθως σταθεροποιούνται μετά από διακοπή χορήγησης του φαρμάκου.
3. Σύνδρομο που μοιάζει με το σύνδρομο Reye's: είναι ένα επικίνδυνο, σπάνιο και ιδιοσυγκρασιακό σύνδρομο. Οι ασθενείς συνήθως εμφανίζουν οξεία περιστατικά υψηλού πυρετού, λήθαργου, ανορεξίας, εμετού, απώλειας συνείδησης και εγκεφαλικό οίδημα.
4. Μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος: οι στεατογενικές παρενέργειες του VPA έχουν διαπιστωθεί από το 1980. Παρατηρήθηκε από ιστολογική επεξεργασία ηπατικού ιστού

ασθενών που θεωρείται ότι απεβίωσαν λόγω ηπατοτοξικότητας από το VPA, και από πειραματικές μελέτες σε ζωικούς οργανισμούς. [33, 34]

Το VPA προκαλεί NAFLD κυρίως μέσω αύξησης του βάρους, υπερινσουλιναιμίας και ανοχής της ινσουλίνης. Η συσχέτιση μεταξύ VPA και αύξησης του βάρους παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1981 και ακόμα και σήμερα οι παθολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Ρυθμίζεται τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά από διάφορα νευροπεπτίδια και κυτοκίνες. Αυτές οι ρυθμιστικές ουσίες περιλαμβάνουν τη ρεζιστίνη (resistin), τον επαγόμενο από τη νηστεία λιπώδη παράγοντα (Fasting-Induced Adipose Factor; FIAF), την αδιπονεκτίνη (adiponectin), τη λεπτίνη (lepin), την γκρελίνη (ghrelin) και την βισφατίνη (visfatin). [35] Το VPA μπορεί να αυξήσει την όρεξη για τροφή ενισχύοντας το σήμα του γαμα-αμινοβουτυρικού οξέος (gamma-aminobutyric acid; GABA) στα μονοπάτια του υποθαλάμου. Μπορεί επίσης να μεταβάλλει την γονιδιακή έκφραση αδιποκινών, όπως η ρεζιστίνη και ο FIAF. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανοχή στην ινσουλίνη και στη λεπτίνη και τελικά σε παχυσαρκία. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν προταθεί σε ασθενείς στους οποίους χορηγούνταν χρόνια VPA.

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η αδιπονεκτίνη είναι πρωτεΐνη της οικογένειας των αδιποκινών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού λιπιδίων και της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, άρα και στη ρύθμιση του σωματικού βάρους. Έχει αποδειχθεί πως το VPA ρυθμίζει αρνητικά την γονιδιακή έκφραση της αδιπονεκτίνης στα λιποκύτταρα και αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα της (adipoR1) στα ηπατοκύτταρα, γεγονός που συμβάλλει στην απορρύθμιση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Η λεπτίνη είναι μια ακόμα πρωτεΐνη της οικογένειας των αδιποκινών, η οποία καταστέλλει την πείνα και αυξάνει το μεταβολισμό λιπαρών οξέων μέσα στα λιποκύτταρα. Τα επίπεδα συγκέντρωσης της στον ορό του αίματος και του mRNA στα λιποκύτταρα, σχετίζονται άμεσα με την έλλειψη ινσουλίνης και το επίπεδο σοβαρότητας της παχυσαρκίας. Τα επίπεδα λεπτίνης και η ανοχή σε αυτήν μπορεί να μη σχετίζονται έμας με το VPA, αλλά μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αφθονίας της στον λιπώδη ιστό. Η γκρελίνη είναι μια ορεξηγενική ορμόνη που δρα αυξάνοντας την όρεξη για τροφή. Τα επίπεδα της στο πλάσμα αυξάνονται πριν από τα γεύματα και μειώνονται μετά από αυτά. Επιπροσθέτως, ρυθμίζει την έκκριση λεπτίνης και ινσουλίνης και επιλεκτικά καταναλώνει υδατάνθρακες έναντι λιπιδίων. Έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων της στην πρώτη περίοδο χορήγησης του VPA. [42]

Η υπερινσουλιναιμία έχει καταγραφεί εκτενώς κατά τη διάρκεια θεραπείας με VPA και είναι γνωστό πως σχετίζεται με την παχυσαρκία, τη δυσλιπιδαιμία και την ανοχή στην ινσουλίνη. Αξίζει να σημειωθεί πως ορισμένοι συγγραφείς δεν θεωρούν την ανοχή στην ινσουλίνη συνέπεια της πρόσληψης βάρους, αλλά την θεωρούν ως μηχανισμό που ωθεί στην αύξηση βάρους. [36] Αυτό υποστηρίζεται από την παρατήρηση πως η παχυσαρκία λόγω VPA σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης αλλά με

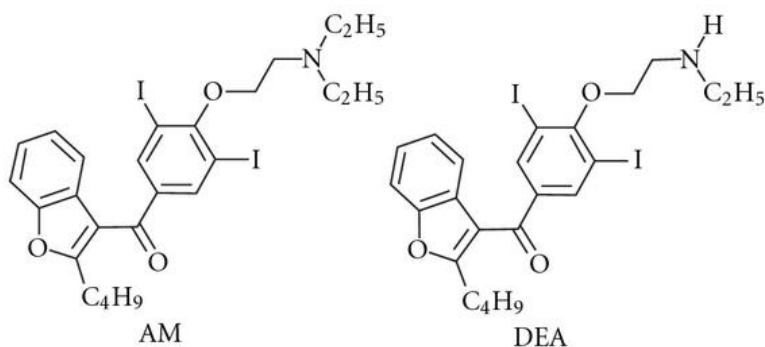
μείωση των επιπέδων γλυκόζης. Μπορεί να διεγείρει την όρεξη και κατά συνέπεια να οδηγήσει σε παχυσαρκία και να οδηγήσει στη διατύπωση της υπόθεσης πως το VPA μπορεί να προκαλεί την ανοχή στην ινσουλίνη. [35] Διάφορες υποθέσεις για τον ρόλο του VPA στην υπερινσουλιναιμία και την ανοχή στην ινσουλίνη έχουν διατυπωθεί: 1) VPA είναι αγωνιστής του GABA και μπορεί να αυξήσει άμεσα τα επίπεδα ινσουλίνης διεγείροντας του υποδοχής του GABA στα β-παγκρεατικά κύτταρα, [37] 2) το VPA και οι μεταβολίτες του μπορούν να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες και να προκαλέσουν δυσλειτουργία των παγκρεατικών β-κυττάρων, [38] 3) το VPA μπορεί να επηρεάσει την απόκριση του συμπαθητικού συστήματος στο φορτίο γλυκόζης, [39] 4) ο μεταβολισμός του VPA μπορεί να ανταγωνιστεί την μιτοχονδριακή οξείδωση των λιπαρών οξέων και άρα να αυξήσει τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος, οδηγώντας σε αύξηση της έκκρισης γλυκόζης από τα παγκρεατικά β-κύτταρα, [40] και 5) το VPA μπορεί να καταστρέψει την μονοπάτι μεταγωγής σήματος της ινσουλίνης αναστέλλοντας την έκφραση του mRNA του GLUT-1, μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφορέα που σχετίζεται με το προαναφερόμενο μονοπάτι.[41, 42]

Όσον αφορά την κλινική εικόνα του ήπατος, το VPA προκαλεί μικροφυσσαλιδώδη στεάτωση. Η μικροφυσσαλιδώδης στεάτωση, προκαλείται από βλάβη στη μιτοχονδριακή β-οξείδωση. Μετά από σύζευξη με το συνένζυμο A (coenzyme A; CoA) και σχηματισμού του βαλπροϊλ-CoA στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, το VPA μπορεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια. Αυτό οδηγεί σε αναστολή της μιτοχονδριακής οξείδωσης των λιπαρών οξέων, καθώς το VPA οξειδώνεται σε διάφορα προϊόντα και κατά συνέπεια ανταγωνίζεται τα ενδογενή λιπίδια για τα ένζυμα του μονοπατιού της οξείδωσης. [43, 44] Το πρώτο στάδιο στο μονοπάτι ενεργοποίησης του VPA είναι η αφυδρογόνωσή του από το κυτόχρωμα P450 (CYP) 2C9 και CYP2A6 και ο σχηματισμός του 4-ενο-βαλπροϊκού. Αυτό ενεργοποιεί έναν επιπρόσθετο μηχανισμό αναστολής της β-οξείδωσης. *In vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει πως το 4-ενο-βαλπροϊκό είναι πιο στεατογενικό και κυτταροτοξικό από το μητρικό φάρμακο. Στη συνέχεια, το 4-ενο-βαλπροϊκό μετασχηματίζεται σε 2,4-διεν-βαλπροϊλ-CoA, το οποίο μπορεί να αδρανοποιήσει τα ένζυμα της β-οξείδωσης. [45, 46] Το VPA μπορεί επίσης να δράσει και ως ανιονικός αποσυζευκτής, μεταφέροντας πρωτόνια στη μιτοχονδριακή μήτρα. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής και να οδηγήσει στο άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου, συμβάλλοντας ως ένας ακόμα μηχανισμός κυτταρικού θανάτου λόγω του VPA. [47] Πρόσφατα περιγράφηκε ένας νέος μηχανισμός ηπατικής στεάτωσης προκαλούμενης από το VPA. Σε αυτόν, το VPA-CoA αναστέλλει τη δράση της τρανφεράσης 1 της παλιτουύλ-καρνιτίνης η οποία μεταφέρει ελεύθερα λιπαρά οξέα στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μιτοχονδριακής πρόσληψης ελεύθερων λιπαρών οξέων και την αύξηση της εισροής τριγλυκεριδίων.[48]

Συνοψίζοντας, ανεξάρτητα από τον εμπλεκόμενο μηχανισμό, το VPA αυξάνει σημαντικά το σωματικό βάρος και κατά συνέπεια την πιθανότητα για παχυσαρκία, ανοχή στην ινσουλίνη και μεταβολικό σύνδρομο. Αυτοί οι παράγοντες αποτελούν τους κύριους παράγοντες επικινδυνότητας για την ανάπτυξη NAFLD, αλλά και καρδιαγγειακών παθήσεων, δυσλιπιδαιμίας και διαβήτη.

1.7.2.2. Amiodarone (AMI)

Το Amiodarone (AMI) είναι ένα μεγάλου μεγέθους αμφίφιλο, δι-ιονισμένο παράγωγο του βενζοφουρανίου, τρίτης τάξης αντιαρρυθμικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία κοιλιακών και κολπικών αρρυθμιών. Η μακροχρόνια θεραπεία με AMI περιορίζεται λόγω μιας πληθώρας εξωκαρδιακών παρενεργειών, όπως η πνευμονική τοξικότητα, η δερματική υπέρχρωση, η δυσλειτουργία του θυρεοειδούς αδένος και η ηπατική ανεπάρκεια λόγω αναστολής της μιτοχονδριακής β-οξειδωσης. Η ηπατική στεάτωση συνήθως προκαλείται σε ποντικούς σε δόση 150 mg/kg/day σε 4-7 μέρες θεραπείας. [49]



Στην πρωτονιωμένη του μορφή, το AMI μπορεί να μετακινείται εύκολα δια μέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Μετά την πρωτονίωση του διαχέεται μέσω της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Μέσα στην σχετικά αλκαλική μιτοχονδριακή μήτρα χάνει την πρωτονιωμένη του κατάσταση και μειώνει το δυναμικό της μεμβράνης. Επιπροσθέτως, αναστέλλει την πρωτεΐνη μεταφοράς των μικροσωμικών τριγλυκεριδίων, η οποία μεταφέρει τριγλυκερίδια και τα συναρμολογεί σε VLDL και χυλομικρά. [50]

Η ηπατοτοξικότητα λόγω AMI προκαλείται σε δύο διακριτά κλινικά περιβάλλοντα: το οξύ που αφορά την γρήγορη ενδοφλέβια έγχυση και το μακροχρόνιο μέσω χρόνιας θεραπείας από στόματος. Στην περίπτωση βαριάς οξείας ηπατίτιδας μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης, οι ανωμαλίες στα ηπατικά ένζυμα εμφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες ή μέρες, και αν και τα περισσότερα δημοσιευμένα περιστατικά ήταν αντιστρεπτά έχει παρατηρηθεί τόσο ηπατική ανεπάρκεια όσο και θάνατος. Στην χρόνια θεραπεία,

ασυμπτωματική αύξηση των επιπέδων των τρανσαμινασών έως και 3 φορές πάνω από το φυσιολογικό όριο έχει παρατηρηθεί στο 50% των ασθενών, αν και σε πιο πρόσφατες έρευνες το ποσοστό αυτό εμφανίζεται μειωμένο. Η λανθάνουσα περίοδος μπορεί να ποικίλει από μερικές εβδομάδες έως χρόνια και σε πάνω από το 90% των ασθενών είναι πάνω από 90 ημέρες. Αν και η ηπατική βλάβη είναι συνήθως αντιστρεπτή, τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων δεν σταθεροποιούνται για κάποιους μήνες. Συμπτωματική ηπατική δυσλειτουργία καταγράφεται στο 1-3% των ασθενών που λαμβάνουν amiodarone. Σε αυτά τα περιστατικά στεάτωσης, τόσο μακροφυσσαλιδώδης όσο και μικροφυσσαλιδώδης στεάτωση είναι τα πιο κοινά παθολογικά χαρακτηριστικά. Η στεατοηπατίτιδα, το «φούσκωμα» των ηπατοκυττάρων και η παρουσίας υαλώδων σωματίων Mallory αλλά και κίρρωση του ήπατος είναι επίσης κοινά. Περιστατικά μικροφυσσαλιδώδους στεάτωσης και ηπατοκυτταρικής νέκρωσης με συμπτώματα που ομοιάζουν με το σύνδρομο Reye's έχουν επίσης παρατηρηθεί. Περίπου το 18% των ασθενών σταματάει τη λήψη του AMI λόγω πρόκλησης NAFLD ή NASH. [49]

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την πρόκληση ηπατικής βλάβης λόγω του amiodarone. Το amiodarone, και ο λιπόφιλος μεταβολίτης του, το desethylamiodarone, έχουν υψηλή συγκέντρωση στο ήπαρ με τρόπο που σχετίζεται περισσότερο με την χορηγούμενη δόση παρά με τη συγκέντρωση του στο πλάσμα του αίματος. Η ηπατική αποθήκευση του amiodarone μπορεί να προκαλέσει φωσφολιπίδωση με χαρακτηριστικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης έγκλειστων πεταλοειδών σωματίων λόγω αυξημένης εισροής φωσφολιπιδίων. Αυτό φαίνεται να είναι γενικό συστηματικό σύμπτωμα κατιονικών αμφίφιλων ουσιών, ανεξάρτητα από την ηπατική βλάβη ή στεατοηπατίτιδα, και πιθανόν να είναι αποτέλεσμα άμεσης αναστολής των φωσφολιπιδίων ή σχηματισμού μη διασπώμενων συσσωμάτων φαρμάκου-λιπιδίων. [49]

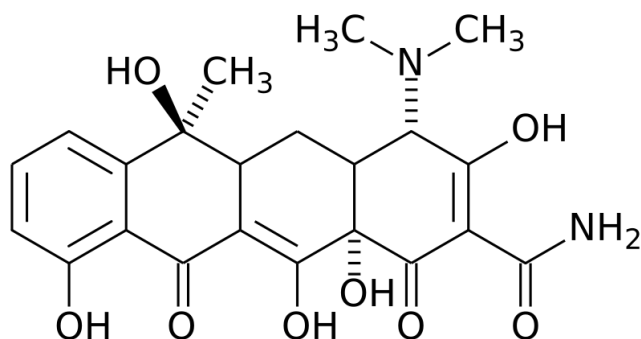
Σε ζωικά μοντέλα, η ηπατική βλάβη που προκαλεί το amiodarone φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη και ανάλογη με τη αυξημένη παραγωγή χοληστερόλης και τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα. Έρευνα σε ποντικούς έδειξε αύξηση της έκφρασης πολλών γονιδίων, μέσα σε αυτά, του υποδοχέα ανδρογόνου και του HNF4α, γεγονός που έχει ως συνέπεια την αύξηση λιπιδίων στο ήπαρ. Επιπροσθέτως, τόσο ο PPARα και PPARγ φαίνονται να αυξάνονται, υποδηλώνοντας συνεχή ανταγωνισμό μεταξύ αυξημένης σύνθεσης λιπιδίων και αυξημένης οξείδωσης λιπαρών οξέων ως απόκριση στο πρώτο. [51] *In vitro* έκθεση HepRG κυττάρων σε amiodarone προκάλεσε φυσαλιδώδη στεάτωση με χαρακτηριστική συσσώρευση τριγλυκεριδίων, με ταυτόχρονη παρουσία σταγονιδίων λιπιδίων και υπερέκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τη λιπογένεση (SREBP1, FAS, και ACL). [52]

Άλλος σημαντικός μηχανισμός που προκύπτει από τη βλάβη λόγω μικροφυσσαλιδώδους στεάτωσης είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Το amiodarone και ο μεταβολίτης του συγκεντρώνονται στα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων και, όπως έχει αποδειχθεί, αναστέλλουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων άρα και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε ζωικά μοντέλα, το amiodarone προκάλεσε μειωμένη μιτοχονδριακή β-οξειδωση και αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου. Άρα η προκαλούμενη ηπατική βλάβη μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τη μιτοχονδριακή β-οξειδωση λιπαρών οξέων και την συνεπαγόμενη πρόκληση μικροφυσσαλιδώδους στεάτωσης, απόπτωσης και νέκρωσης. [53]

Το dronedarone, ένα μη ιονισμένο παράγωγο του amiodarone και τάξης III αντιαρρυθμικό φάρμακο, προτάθηκε έναντι του amiodarone ως λιγότερο ηπατοτοξικό. Ωστόσο έχει αποδειχθεί πως και αυτό έχει την ίδια δυναμική αναστολής στις μιτοχονδριακές αναπνευστικές αλυσίδας και β-οξειδωσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε dronedarone, έγινε αναστολή της μιτοχονδριακής β-οξειδωσης λόγω μειωμένης ενεργότητας της παλιτουλτρανσφεράσης 1 της καρνιτίνης (carnitine palmitoyltransferase I; CPT1) στα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων, χωρίς να επηρεάζεται η αναπνευστική αλυσίδα *ex vivo*. [54]

1.7.2.3. Τετρακυκλίνες (Tetracyclines; TET)

Οι τετρακυκλίνες (tetracyclines; TET) είναι ευρέως φάσματος αντιβιοτικά και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα, λόγω της ενεργότητας τους έναντι gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων, αλλά και μη-τυπικών οργανισμών όπως το μυκόπλασμα και το *chlamidiae*. Οι τετρακυκλίνες ήταν από τα πρώτα φάρμακα που διαπιστώθηκε ότι προκαλούν μικροφυσσαλιδώδη στεάτωση, που τυπικά εμφανίζεται 4-10 ημέρες μετά από ενδοφλέβια χορήγηση υψηλών δόσεων. [55]



Μικροφυσσαλιδώδης στεάτωση έχει παρατηρηθεί στα παρεγχυματικά ηπατοκύτταρα μετά από χορήγηση τετρακυκλινών σε ανθρώπους και τρωκτικά. Αν και η χημικά προκαλούμενη στεάτωση είναι συνήθως αντιστρεπτή, επικίνδυνες μορφές μπορούν να προκαλέσουν θάνατο. Η πρώτη περιγραφή

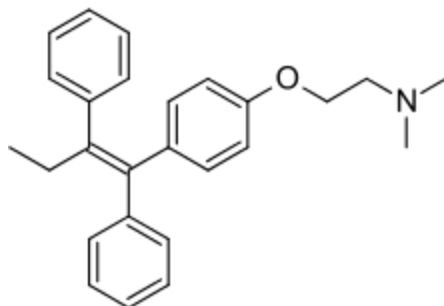
λιπώδους ήπατος περιγράφηκε το 1951 σε ανθρώπους που λάμβαναν μεγάλες δόσης τετρακυκλίνης ενδοφλεβίως ή από στόματος. [56]

Οι κυτταρικές επιδράσεις τετρακυκλίνης παρατηρήθηκαν αρχικά είτε μέσω βιοψίας ήπατος είτε σε απομονωμένο ήπαρ μετά από *in vivo* έκθεση σε αυτήν. Αξίζει να σημειωθεί πως τα πρώτα στοιχεία *in vitro* ηπατικής στεάτωσης ήρθαν στο φως μέσω ενός μοντέλου με τετρακυκλίνη. Αυτό το πειραματικό μοντέλο επέτρεψε την διερεύνηση κάποιων μοριακών μονοπατιών που σχετίζονται με τη συσσώρευση λιπιδίων, όπως ότι το ενδοκυτταρικό φορτίο τριγλυκεριδίων σχετίζεται με μείωση της μιτοχονδριακής β-οξειδωσης. [57] Από τότε, διάφορες *in vitro* μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της βιοχημικής βάσης της μη φυσιολογικής συσσώρευσης λιπιδίων και σήμερα οι μηχανισμοί πρόκλησης λιπώδους ήπατος είναι καλά τεκμηριωμένοι. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν κυρίως την αναστολή της οξειδωσης λιπαρών οξέων και την ηπατική έκκριση λιποπρωτεϊνών. Το λιπώδες ήπαρ έχει αποδοθεί επίσης και στη συσχέτιση μεταξύ τριγλυκεριδίων και αποπρωτεϊνών προς σχηματισμό λιποπρωτεϊνών. [58]

Πρόσφατες μελέτες γονιδιακής έκφρασης έδειξαν πως πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη μεταφορά λιπαρών οξέων και στην εστεροποίηση τριγλυκεριδίων σχετίζονται με την ανάπτυξη στεάτωσης. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι η τρανσλοκάση των λιπαρών οξέων (Fatty Acid translocase; FAT; CD36) και η διακυλ-γλυκερολ-ακυλοτρανφεράση (diacylglycerol acyltransferase 2; DGAT2), η έκφραση των οποίων αυξήθηκε μετά από *in vitro* έκθεση HepG2 κυττάρων σε τετρακυκλίνη. Επιπροσθέτως, η τετρακυκλίνη ρύθμιζε αρνητικά την φωσφορυλίωση της κινάσης που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα (extracellular signal-regulated kinase; ERK), που με τη σειρά της μείωσε την DGAT2. [59]

1.7.2.4. Tamoxifen (TMX)

Το tamoxifen (TMX) είναι εκλεκτικός ρυθμιστικός υποδοχέας οιστρογόνων (selective estrogen receptor; SERM) και golden standard για τη θεραπεία καρκίνου του μαστού που σχετίζεται με οιστρογόνα. Μπορεί να δράσει τόσο αγωνιστικά όσο και ανταγωνιστικά, εκτελώντας πληθώρα τόσο ευεργετικών όσο και επιβλαβών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης των επιπέδων LDL, αύξησης της οστικής μάζας και μεγάλης επικινδυνότητας ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου. Στον ιστό του μαστού παρεμποδίζει την σηματοδότηση των οιστρογόνων και μειώνει έτσι το ρυθμό θανάτου λόγω καρκίνου του μαστού.



Άλλη γνωστή παρενέργεια του tamoxifen είναι η πρόκληση ηπατικής στεάτωσης. Εκδηλώνεται ως αύξηση των ηπατικών ενζύμων σε περίπου 43% των ασθενών, τα οποία κανονικοποιούνται μετά από 6 μήνες διακοπές της χορήγησης του. Τα πιο συχνά ευρήματα στο λιπώδες ήπαρ είναι μέτριας μορφής στεατοηπατίτιδας, μικροφυσσαλιδώδης στεάτωση και σπανίως κίρρωση. Οι παράγοντες που σχετίζονται με την ηπατική βλάβη λόγω του tamoxifen είναι αυτοί των κοινών παραγόντων επικινδυνότητας της NAFLD και περιλαμβάνουν ανοχή στη γλυκόζη και διαβήτη, υπερλιπιδαιμία και υπέρταση. [51]

Όπως και το amiodarone, το tamoxifen είναι ένα αμφίφιλο φάρμακο που πρωτονιώνεται στο διαμεμβρανικό χώρο των και αποπρωτονιώνεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων ώστε να μεταφερθεί μέσω της εσωτερικής μεμβράνης. Αυτή η απώλεια των πρωτονίων αποσυνθέτει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Το tamoxifen διαταράσσει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και μειώνει την αναγέννηση συμπαραγόντων οξειδωτικού στρες, όπως το NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) και το FAD (Flavin adenine dinucleotide). [60]

In vitro έκθεση της κυτταρικής σειράς HepG2 σε tamoxifen έδειξε πρόκληση ηπατικής στεάτωσης και αυξημένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμα. Ο μηχανισμός που προτάθηκε αφορούσε την αύξηση της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων μέσω θετικής ρύθμισης του SREBP-1c και των υπό αυτόν ρυθμιζόμενων γονιδίων της λιπογένεσης. Επιπροσθέτως, η συσσώρευση τριγλυκεριδίων αύξησε την έκφραση της πρωτεΐνης μεταφοράς μικροσωμικών τριγλυκεριδίων (microsomal triglyceride transfer protein; MTP), που σχετίζεται με τη συναρμολόγηση και έκκριση των VLDL. *In vivo* μοντέλα υποστηρίζουν αυτά τα ευρήματα, προτείνοντας τη *de novo* βιοσύνθεση λιπαρών οξέων ως το κύριο γεγονός που οδηγεί σε ηπατική στεάτωση. [61]

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων είναι ακόμα υπό αμφισβήτηση. Μελέτες σε ποντικούς έδειξαν πως το tamoxifen συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια όπου αναστέλλει τη β-οξείδωση και την αναπνοή, εν μέρει μέσω αναστολής του CPT I, το ένζυμο που ρυθμίζει το ρυθμό της β-οξείδωσης, και εν μέρει μέσω αναστολής των τοποϊσομερασών, καταστρέφοντας τελικά το μιτοχονδριακό DNA. [62] Ωστόσο *in vitro*

μελέτη σε HepG2 κύτταρα δεν έδειξε καμία επίδραση του tamoxifen στο CPT I. [61] Ομοίως, άλλα μοντέλα τρωκτικών έχουν επίσης δείξει πως το tamoxifen δεν επηρεάζει την έκκριση τριγλυκερόλης και την οξείδωση λιπαρών οξέων. [63] Σημαντικό ρόλο όμως φαίνεται να διαδραματίζει το οξειδωτικό στρες. Μελέτες σε αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκε tamoxifen έδειξαν εξάντληση της ηπατικής γλουταθειόνης και συσσώρευση οξειδωμένης γλουταθειόνης, υπεροξείδωση των λιπιδίων και αναστολή της ηπατικής ενεργότητας της ρεντουκτάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase; GR), της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase; GPx), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase; SOD) και της CAT. [64]

1.7.2.5. Λοιπά φάρμακα

- *Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα*

Το αναλγητικό, αντιπυρετικό και αντιφλεγμονώδες φάρμακο ακετυλοσαλικυλικό οξύ είναι επίσης γνωστό ότι προκαλεί σύνδρομο Reye's, ένα θανατηφόρο σύνδρομο σε παιδιά που χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, εμετό, εγκεφαλοπάθεια και ηπατική ανεπάρκεια. Η τελευταία συνοδεύεται από συσσώρευση σταγονιδίων λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, κυρίως λόγω του σαλικυλικού, του κύριου τοξικού μεταβολίτη του ακετυλοσαλικυλικού οξέος. Το σαλικυλικό προκαλεί διόγκωση των μιτοχονδρίων, αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, βλάβη στη μιτοχονδριακή αναπνοή και αναστολή της σύνθεσης του ATP. Άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως το ibuprofen και το pirofen, έχουν βρεθεί να επιδρούν στη μιτοχονδριακή β-οξείδωση και να προκαλούν μικροφυσσαλιδώδη στεάτωση. Και τα δύο εναντιομερή του ibuprofen αναστέλλουν τη β-οξείδωση και την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά μόνο το *R* εναντιομερές μπορεί να συνδεθεί με το CoA και στερεοειδικά να αναστείλει την πρόσληψη και οξείδωση των λιπαρών οξέων. Αντίθετα, το pirofen καταστέλλει τη λειτουργία της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης μεταφοράς τριγλυκεριδίων. Επιπροσθέτως, τόσο το diclofenac όσο και το nimesulide έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση και να προωθούν το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας. Το acetaminophen προκαλεί βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA, αναστέλλει την οξειδωτική φωσφορυλίωση και προκαλεί άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας. [49]

- *Methotrexate*

Η μεθοτρεξάτη (methotrexate) χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ψωρίασης, της ψωριατικής αρθρίτιδας, της νόσου φλεγμονώδους εντέρου και της νόσου Crohn. Δρα μέσω αναστολής της παραγωγής φολικού οξέος, ενός κύριου ρυθμιστή στη σύνθεση RNA και DNA. Η methotrexate μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο μέσω του οργανικού ανιο-μεταφορέα πολυπεπτιδίου 1B1

(organic anion-transporting polypeptide 1B1) και αναστέλλει στην αναπνευστική αλυσίδα. Ασθενείς με παράγοντες επικινδυνότητας όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν ηπατοτοξικότητα με ιστολογικά χαρακτηριστικά που μοιάζουν με τη NASH. [65]

- *Irinotecan*

Το irinotecan είναι αναστολέας της τοποϊσομεράσης 1 και πολύ ενεργό αντινεοπλαστικό φάρμακο. Είναι χημειοθεραπευτικό συστατικό έναντι του καρκίνου του εντέρου και των πνευμόνων. Η χρήση του έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη NASH. [66]

- *Amineptine και tianeptine*

Το amineptine και το tianeptine είναι τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα, αναστέλλουν την β-οξειδωση και προκαλούν μικροφυσσαλιδώδη στεάτωση σε ποντίκια μετά από χορήγηση υψηλών δόσεων. Εκτός από την άμεση αναστολή της οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων, και τα δύο φάρμακα επιδρούν αρνητικά στην ενεργότητα της μιτοχονδριακή πρωτεΐνης μεταφορά τριγλυκεριδίων. [67]

- *Stavudine και Zidovudine*

Τα *Stavudine* και *Zidovudine* είναι αντιρετροϊκοί αναστολείς της νουκλεοτιδικής αντίστροφης μεταγραφάσης και σημαντικά συστατικά της θεραπείας ασθενών με HIV. Μπορούν να προκαλέσουν ηπατική στεάτωση καταστρέφοντας το μιτοχονδριακό DNA με παρόμοιο μηχανισμό. [68]

- *Perhexiline*

Η perhexiline είναι προφυλακτικός παράγοντας κατά της στηθάγχης. Αναστέλλει την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την παλμιτοϋλ-τρανσφεράση 1 της καρνιτίνης. Ασθενείς που λαμβάνουν αυτό το φάρμακο εμφανίζουν μέτρια αύξηση του λίπους στο ήπαρ μαζί με στεατοηπατίτιδα. [69]

- *Cycloheximide*

Το cycloheximide παρεμποδίζει την πρόσδεση του tRNA στο mRNA και προκαλεί ηπατική στεάτωση σε ποντικούς. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως αυτό προκαλείται μέσω αυξημένης ηπατικής πρόσληψης ελεύθερων λιπαρών οξέων, μη ισορροπία μεταξύ οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων και εστεροποίησης και αναστολής της έκκρισης VLDL. Προσφάτως, ερευνητές έδειξαν πως μπορεί να μειώσει την ηπατική έκκριση λιπιδίων λόγω οξείας μείωσης της απολιποπρωτεΐνης B, η οποία είναι υπεύθυνη για το πακετάρισμα των VLDL. [70]

- *Bisphenol A (BPA)*

Έκθεση του ανθρώπου στη συνθετική οργανική ένωση Bisphenol A (BPA), κύριο συστατικό πολλών πλαστικών συσκευασιών, θεωρείται πως είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη παχυσαρκίας και άλλων μεταβολικών συνδρόμων, όπως η ανοχή στην ινσουλίνη, ο διαβήτης τύπου 2 και η NAFLD. Συγκεκριμένα, θεωρείται πως επιδρά έμμεσα στην ομοιοστάση λιπιδίων και υδατανθράκων στα ηπατοκύτταρα ή άμεσα στην ανοχή στην ινσουλίνη. Ωστόσο, παρά την πληθώρα ερευνών, οι ακριβείς μηχανισμοί πίσω από την επίδραση του δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Αξίζει να σημειωθεί πως οι επιδράσεις του μπορεί να είναι πιο δυσμενείς όταν η έκθεση σε αυτό γίνεται κατά την περιγεννητική ή κατά το πρώτα μετα-γεννητικά έτη. [71]

1.8. State-of-the-art: *in vitro* μοντέλα για τη μελέτη της Μη Αλκοολικής Λιπώδης Νόσου του Ήπατος

Πρόοδος στην παθοφυσιολογία της εισροής λίπους στο ήπαρ έγινε σημειώθηκε αρχικά με τη χρήση διαφόρων ζωικών μοντέλων και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε από κλινικές μελέτες. Η χρήση μοντέλων μυών στα οποία έχει προκληθεί η νόσος μέσω δίαιτας ή γενετικά τροποποιημένων μυών συνέβαλλε σημαντικά στην κατανόηση της NAFLD και ακόμα και σήμερα αποτελούν την πιο συνήθη στρατηγική εργαστηριακής έρευνας. Ωστόσο, σε αντίθεση με άλλες ηπατικές ασθένειες στις οποίες τα *in vitro* μοντέλα αποτελούν σημαντικά εργαλεία έρευνας, λίγα δεδομένα από τέτοια μοντέλα υπάρχουν για την NAFLD. Παρόλα τα πλεονεκτήματα των *in vitro* μοντέλων στην ανάλυση μοριακών μηχανισμών του ήπατος, η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της απλοϊκής τους κατασκευής σε αντίθεση με την πολυπλοκότητα ολόκληρου του οργάνου όπου αλληλοεπιδρούν πολλοί τύποι κυττάρων για την επίτευξη των επιμέρους λειτουργιών. [28]

1.8.1. Μονοστρωματικές καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων

Οι καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων θεωρούνται τα πιο σχετιζόμενα με την *in vivo* κατάσταση *in vitro* μοντέλα. Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα τυπικά απομονώνονται από ιστό που έχει πρόσφατα αφαιρεθεί μέσω της τεχνικής αιμάτωσης με κολλαγενάση σε δύο στάδια. Μειονέκτημα της χρήσης τους αποτελεί το γεγονός ότι σταδιακά χάνουν την μορφολογία τους και τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά σε δισδιάστατες καλλιέργειες. Αυτό δεν μειώνει την αξία τους στην πειραματική έρευνα της ηπατικής στεάτωσης. Γενικά, η χρήση των πρωτογενών κυττάρων μειώνει σημαντικά την επαναληψιμότητα των πειραμάτων καθώς σχετίζεται άμεσα με την προέλευση του δείγματος. Τα πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα θεωρητικά μπορούν να αποτελέσουν το πλησιέστερο στις κλινικές καταστάσεις μοντέλο. Η χρήση τους ωστόσο, αποτελεί πρόκληση, λόγω της μικρής τους διαθεσιμότητας, της φαινοτυπικής

αστάθειας και της χαμηλή βιωσιμότητας τους. Επιπροσθέτως, η εισροή τρυγλυκεριδίων στον κυτταρόπλασμα των πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων αυτών προκαλεί μειωμένη έκφραση των ενζύμων CYP, γεγονός που επηρεάζει των μεταβολισμό των χορηγούμενων φαρμάκων. [49]

1.8.2. Μονοστρωματικές καλλιέργειες ηπατικών κυτταρικών σειρών

Αξιόπιστη εναλλακτική στην χρήση των πρωτογενών ηπατοκυττάρων αποτελούν οι ηπατικές κυτταρικές σειρές που πλεονεκτούν ως προς τα πρώτα στα εξής: 1) εμφανίζουν σταθερή αύξηση, 2) έχουν θεωρητικά άπειρη διάρκεια ζωής, 3) έχουν σταθερό φαινότυπο, 4) είναι εύκολα διαθέσιμες, 5) απαιτούν απλούστερες συνθήκες καλλιέργειας. Δυστυχώς ωστόσο εμφανίζουν και διάφορα μειονεκτήματα, καθώς τόσο η πηγή των κυττάρων (νεοπλασματικά ή μη νεοπλασματικά), όσο και η μέθοδος αθανатоποίησης μπορούν να μεταβάλλουν κάποιες μεταβολικές λειτουργίες άρα και τα πειραματικά αποτελέσματα. [72]

Η κυτταρική σειρά HepG2, η οποία προέρχεται από ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, μπορεί να διατηρήσει διάφορες βιοχημικές λειτουργίες των ηπατικών παρεγχυματικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ιδιότητας να εκκρίνουν λιποπρωτεΐνες. Κατά συνέπεια, η HepG2 κυτταρική σειρά αποτελεί αξιόπιστο μοντέλο για τη μελέτη του ανθρώπινου μεταβολισμού λιπιδίων. Κύτταρα HepG2 τα οποία εκτίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις ολεϊκού ή παλμιτικού οξέος εμφανίζουν ενδοκυτταρική συσσώρευση σταγονιδίων λιπιδίων και τριγλυκεριδίων. [73] Ομοίως, το tamoxifen προκαλεί αύξηση των ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων σε καλλιέργειες HepG2 κυττάρων. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι τα HepG2 δεν εκφράζουν τα ένζυμα CYP τα οποία είναι σημαντικά για το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών, για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορες άλλες κυτταρικές σειρές, όπως τα HepG2/C3A. [61]

Η κυτταρική σειρά HepRG προέρχονται από θηλυκό άτομο με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Όταν καλλιεργούνται σε μικρή πυκνότητα αποκτούν γρήγορα τις προγονικές τους ιδιότητες δύο τύπων και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα που μοιάζουν με ηπατοκύτταρα και κύτταρα που μοιάζουν με χολικά κύτταρα. Τα HepRG κύτταρα εμφανίζουν σημαντικές ηπατικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ενεργότητας των CYP ενζύμων, είναι λειτουργικά σταθερά και έχουν μεγάλο δυναμικό αύξησης. Αποτελούν λοιπόν σημαντικά υποσχόμενο μοντέλο για τη μελέτη ηπατικής στεάτωσης, καθώς συσσωρεύουν σταγονίδια λιπιδίων μετά από έκθεση σε στεραϊκό οξύ, παλμιτικό οξύ, ολεϊκό οξύ και amiodarone. [28]

In vitro έκθεση HepRG κυττάρων σε amiodarone και tetracycline προκάλεσε φυσαλιδώδη στεάτωση με χαρακτηριστική συσσώρευση τριγλυκεριδίων, με ταυτόχρονη παρουσία σταγονιδίων λιπιδίων και υπερέκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τη λιπογένεση (SREBP1, FAS, και ACL). Τα ίδια κύτταρα εκτεθειμένα σε ολεϊκό οξύ έδειξαν τον ίδιο φαινότυπο, αλλά μη κανονική έκφραση διαφορετικών

γονιδίων (FASN, SCD1, THSPR), υποδηλώνοντας διαφορετικό μηχανισμό πρόκλησης ηπατικής στεάτωσης. [52]

HerRG μονοστρωματικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν και για τη διερεύνηση ηπατικής στεάτωσης που προκαλεί το BPA, σε ένα *in vitro* μοντέλο που μπορεί να μιμηθεί την περιγενετική έκθεση στην ουσία αυτή. Το BPA προκάλεσε στεάτωση σε αυτά τα κύτταρα με μη-μονοτονικό προφίλ δόσης-απόκρισης. Ωστόσο η έκφραση πολλών ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό λιπιδίων και την ομοιόσταση υδατανθράκων δεν φάνηκε διαφοροποιήθηκε. [71]

Η ίδια συσσώρευση σταγονιδίων λιπιδίων παρατηρείται και σε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς HuH7. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μια καλά διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. [74]

Ως πιθανή πηγή κυττάρων για τη μελέτη ηπατικών ασθενειών έχουν προταθεί και τα βλαστοκύτταρα. Τόσο πολυδύναμα (pluripotent-induced pluripotent stem cells; iPSCs) όσο και εμβρυονικά (embryonic stem cells; ESCs) βλαστοκύτταρα, αλλά και πολυδύναμα μετά τον τοκετό βλαστοκύτταρα, μπορούν να μετασχηματιστούν σε κύτταρα με ηπατικές ιδιότητες. Ερευνητές έδειξαν πως πρόδρομο κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινο δερματικό ιστό (human skin-derived precursors; hSKPs) μπορούν να αποκτήσουν ιδιότητες ηπατοκυττάρων και να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της επίδρασης οξείας ηπατοτοξικότητας. Αυτά τα κύτταρα (hSKP-derived hepatic cells; hSKP-HPCs) αξιολογήθηκαν ως προς τη χρήση τους για τη μελέτη της επίδρασης στεατογενικών ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση του VPA σε αυτά, σε σύγκριση με την επίδραση του σε καλλιέργειες πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, κύριος παράγοντας εμφάνισης ηπατικής στεάτωσης, ήταν εμφανής σε αυτά τα κύτταρα, όπως και συσσώρευση ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων. Το μέγεθος και το λιποσταγονιδίων και το γεγονός ότι δεν υπήρχε μετατόπιση του πυρήνα υποδηλώνουν την ύπαρξη μικροφυσσαλιδώδους στεάτωσης, που είναι γνωστό ότι προκαλεί το VPA. Τέλος, τα hSKP-HPCs, εξέφρασαν τους τυπικούς πρωτεϊνικούς μάρτυρες NAFLD, όπως ο PPAR και ο FAS, ομοίως με τα πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. [75]

1.8.3. Συν-καλλιέργειες

Η καλλιέργεια ηπατοκυττάρων με μη παρεγχυματικά κύτταρα ρυθμίζει την ανάπτυξη και την μορφολογία των ηπατοκυττάρων, και αυξάνει την λειτουργικότητά τους. Συν-καλλιέργεια ηπατοκυττάρων με κύτταρα Kurppfer ή ινοβλάστες προσφέρει βελτιωμένη βιωσιμότητα και λειτουργικότητα στα ηπατοκύτταρα. [49] Συν-καλλιέργειες HuH7 κυττάρων και LX-2 ηπατικών αστεροειδών κυττάρων που εκτέθηκαν σε μείγμα ολεϊκού και παλμιτικού οξέος βρέθηκαν να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά λίπος. Σε αυτές τις συν-

καλλιέργειες τα αστεροειδή κύτταρα ενεργοποιήθηκαν, όπως εκτιμήθηκε από την έκφραση της α-ακτίνης και παρατηρήθηκε μια χρονοεξαρτώμενη άυξηση του αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2, υποδηλώνοντας επαυξημένη βιοσύνθεση κολλαγόνου. [76] Ομοίως, η έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης της μήτρας 2 και άλλων προ-ινωτικών γονιδίων, όπως ο αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης 1 και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β, αυξήθηκε σε συν-καλλιέργεια πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων με αστεροειδή κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί παλμιτικό οξύ. [77]

Συν-καλλιέργειες μικρο-μοτίβου επιτρέπουν την ανάπτυξη ετερογενών επιφανειών όπου υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της αλληλεπίδρασης κυττάρου-κυττάρου στην τάξη μικρών. Αυτό επιτρέπει τη διαμόρφωση του φαινοτύπου των ηπατικών κυττάρων *in vitro*. [78] Πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα σε συν-καλλιέργεια με εμβρυονικούς ινοβλάστες μυών διατηρούν την μορφολογία τους, την γονιδιακή έκφραση και τη λειτουργικότητα σου έως 6 εβδομάδες. [79] Επιπροσθέτως, η χρήση τέτοιων καλλιιεργειών προσδίδει υψηλή ευαισθησία σε πειράματα ηπατοτοξικότητας σε σύγκριση με της κλασσικές δισδιάστατες καλλιέργειες. Σε αυτό το πλαίσιο, πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα συν-καλλιιεργήθηκαν με στρωματικούς ινοβλάστες και κατασκευάστηκε ένα ισχυρό *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη του μεταβολισμού της γλυκόζης, μονοπάτι που σχετίζεται στενά με τη NAFLD. Στο μοντέλο αυτό, τα ηπατοκύτταρα διατήρησαν τη βιωσιμότητα τους για αρκετές εβδομάδες ώστε να μπορέσει να μελετηθεί η επίδραση φαρμάκων στον διαβήτη. [80]

1.8.4. Καλλιέργειες sandwich

Προκειμένου να παρακαμφθεί η γρήγορη απώλεια της λειτουργικότητας και μορφολογίας των πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε μονοστρωματικές καλλιέργειες σε επιφάνεια πολυεστυρένιου, συχνά χρησιμοποιούνται καλλιέργειες sandwich. Πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα που καλλιιεργήθηκαν ανάμεσα σε στρώσεις κολλαγόνου τύπου 1 έδειξαν μειωμένη απώλεια της λειτουργικότητας τους και επέτρεψαν την διενέργεια πειραμάτων μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας. [81] Ηπατοκύτταρα απομονωμένα από αρουραίους που καλλιιεργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, ανέπτυξαν μικροφυσσαλιδώδη και μακροφυσσαλιδώδη στεάτωση μετά από 3 ή 6 μέρες έκθεση σε ολεϊκό και λινολεϊκό οξύ. [82] Επιπροσθέτως, πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα σε sandwich καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε chlorpromazine έδειξαν μεταβολές στο γενετικό προφίλ που σχετίζεται με την ίνωση, την φλεγμονή, τη νέκρωση και τη στεάτωση. [83] Πρωτογενή ηπατοκύτταρα αρουραίου καλλιιεργήθηκαν μεταξύ δύο στρώσεων κολλαγόνου και συσώρευσαν σταγονίδια λιπιδίων μετά από έκθεση σε βαλπροϊκό οξύ, τετρακυκλίνες, amiodarone ή tamoxifen. [84]

1.8.5. Σφαιροειδής καλλιέργειες

Επίπεδα συστήματα καλλιέργειας δεν είναι αντιπροσωπευτικά της πολύπλοκης αρχιτεκτονικής του ηπατικού ιστού *in vivo*. Η καλλιέργεια ηπατοκυττάρων σε σφαιροειδής καλλιέργειες μπορεί να βελτιώσει κάποια λειτουργικά χαρακτηριστικά τους λόγω της ανάπτυξης αλληλεπιδράσεων κυττάρου-κυττάρου και της παρουσίας στοιχείων εξωκυττάριας μήτρας ανάμεσα και γύρω από το αδρανές υλικό. Μέχρι σήμερα, η χρήση σφαιροειδών καλλιέργειών για την μελέτη της NAFLD είναι περιορισμένη. [81] Ηπατοκύτταρα H32 αρουραίου σε σφαιροειδής καλλιέργειες εκτέθηκαν σε ελευθέρω λιπαρά οξέα και επέδειξαν συσσώρευση λιπιδίων και τριγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμα, και κατά συνέπεια αύξηση δραστηριών ριζών οξυγόνου. [85] Σφαιροειδής καλλιέργειες HepG2 κυττάρων κατεργασμένες με ολεϊκό οξύ έχουν αποδειχθεί χρήσιμο *in vitro* εργαλεία για τη μελέτη της ηπατικής στεάτωσης. Σε αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα ήταν λιγότερο ευαίσθητα στην προ-οξειδωτικά και από κυτοκίνες βλάβη, μέσω ενός προσαρμοστικού μηχανισμού που εξαρτάται από την ενεργότητα μιας πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από την μονοφωσφορική αδενοσίνη. [86] Επιπροσθέτως, ένα άλλο σφαιροειδές μοντέλο πρωτογενών ηπατοκυττάρων αρουραίου έδειξε υψηλότερα επίπεδα ενδοκυτταρικού φορτίου γλυκαγόνου, κατανάλωση γλυκόζης, δραστηριότητα γλυκονογένεσης, και ευαισθησία στην ινσουλίνη και στο γλυκογόνο πιο κοντά στην *in vivo* κατάσταση, σε αντίθεση με τις μονοστρωματικές καλλιέργειες. Η έκθεση αυτών των κυττάρων σε υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης προήγαγε τοξικότητα, συμπεριλαμβανομένων αλλαγών στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, συσσώρευση λιπιδίων και σχηματισμό δραστηριών ριζών οξυγόνου. [87]

1.8.6. Υψηλής ακρίβειας ηπατικές τομές

Οι υψηλής ακρίβειας ηπατικές τομές μπορεί να είναι ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία στη μελέτη του μεταβολισμού λιπιδίων, ειδικά εφόσον θεωρείται πως αντικατοπτρίζουν σε μεγάλο βαθμό την *in vivo* κατάσταση. Σε αυτά τα συστήματα είναι παρόντες όλοι οι κυτταρικοί τύπου του ήπατος και κατά συνέπεια διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας. Ωστόσο, αν και θεωρούνται εξαιρετικά *in vitro* μοντέλα, δεν έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά στην έρευνας της NAFLD. [49] Τομές εκτεθειμένες σε βαλπροϊκό οξύ, amiodarone και τετρακυκλίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση γονιδίων που η έκφραση τους μεταβάλλεται από στεατογενικά φάρμακα. Ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε πως το βαλπροϊκό οξύ και το amiodarone ρυθμίζουν θετικά το μεταβολισμό λιπιδίων, ενώ μονοπάτια που σχετίζονται με την αναδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και της φλεγμονής ρυθμίζονται αρνητικά. Η τετρακυκλίνη προκαλεί μείωση των μιτοχονδριακών λειτουργιών, του μεταβολισμού λιπιδίων και την ίνωσης. [88] Τομές από παχύσαρκα ποντίκια έδειξαν μειωμένη έκκριση VLDL σε ποντίκια με έλλειψη CD36, γεγονός που υπογραμμίζει την σημαντικότητα του CD36 και των VLDL στην ανάπτυξη της NAFLD. [89]

1.9. *In vitro* Βιοδείκτες

Οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αμερόληπτοι διαφορικοί δείκτες έναρξης της νόσου, να βοηθήσουν στην κατηγοριοποίηση ασθενούς ή μη-ασθενούς κατάστασης, να αναγνωρίσουν το στάδιο μιας νόσου ή/και να προσφέρουν πληροφορίες για τη βαρύτητα της. Το ρίσκο ενός ατόμου για ανάπτυξη μιας νόσου μπορεί επίσης να αναγνωριστεί από τους βιοδείκτες. Οι μη επεμβατικοί βιοδείκτες μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αναγνώριση νέων ασθενειών και στην αποτελεσματικότητα κλινικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων αυτών. Ωστόσο ελάχιστοι έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα για τη NAFLD.

1.9.1. Βιοδείκτες απόπτωσης

Η μέτρηση βιοδεικτών απόπτωσης στον ορό θεωρείται μη επεμβατική αναγνώριση των σταδίων ίνωσης σε ασθενείς με χρόνιες ασθένειες ήπατος καθώς η απόπτωση είναι σημαντικός μηχανισμός ίνωσης. Η κυτοκερατίνη 18 (cytokeratin-18; CK-18) είναι σημαντική πρωτεΐνη του ήπατος, που κόβεται από τις κασπάσες κατά την απόπτωση των ηπατοκυττάρων. Έχουν αναπτυχθεί 3 μέθοδοι βασιζόμενες στην ELISA για την μέτρηση της CK-18 και των θραυσμάτων της: 1) η M30 ποσοτικοποιεί την ηπατοκυτταρική απόπτωση μέσω των θραυσμάτων της που προκαλούν οι κασπάσες, 2) η M65 (M6 αντίσωμα πρόσδεσης και M5 αντίσωμα εντοπισμού) και 3) η M65ED (M5 αντίσωμα πρόσδεσης και M6 αντίσωμα εντοπισμού) εντοπίζουν τον κυτταρικό θάνατο συνολικά μέσω αναγνώρισης τόσο της CK-18 όσο και των θραυσμάτων της. Και οι τρεις αυτές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαφορική διάγνωση μεταξύ NAFLD και NASH, ωστόσο μόνο οι M65 και M65ED μπορούν να διαχωρίσουν τους ασθενείς με NAFLD από τα υγιή δείγματα. [90]

Δύο μοντέλα που συνδυάζουν την CK-18 και το υαλουρονικό οξύ, και την CK-18 και τον διαλυτό Fas, έδειξαν υψηλή διαγνωστική αξία για το διαχωρισμό ασθενών NAFLD με NASH ή όχι. Ο διαλυτός συνδέτης Fas βρέθηκε αυξημένος σε ασθενής NAFLD με ίνωση σε σύγκριση με αυτούς χωρίς ίνωση. Επίσης, διπλός ιστολογικός ανοσοεντοπισμός CK-8/18 και ουβικιτίνης βελτίωσε τον εντοπισμό ηπατοκυτταρικής βλάβης σε δείγματα βιοψίας NAFLD. [91] Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό «φουσκαμένων» ηπατοκυττάρων, καθώς σε αυτά λείπει η CK-8/18. Η χρώση συσχετίστηκε με το στάδιο ίνωσης, συγκεκριμένα προχωρημένης ίνωσης και στεατοηπατίτιδας σε δείγματα βιοψίας 40 ενηλίκων με NAFLD. [92]

Ο αριθμός ηπατικών προγονικών κυττάρων και η δραστηριότητα των μικροσωληνίσκων εκτιμήθηκαν μέσω ανοσοεντοπισμού της CK-7, και αυτό χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης διαφορετικών σταδίων ίνωσης σε 38 παιδιά με NASH. Αν και η παρουσία CK-7 θετικών ηπατοκυττάρων ήταν της τάξης του 64,3% σε

δείγματα βιοψίας ασθενών με NASH, ο ανοσοεντοπισμός αυτός δεν ήταν δυνατόν να συσχετισθεί με το στάδιο της ίνωσης ή το βαθμό της στεάτωσης. [93]

Σημαντικά υψηλή ενεργότητα κασπάσης 3 και κασπάσης 8 έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με NASH σε σχέση με ασθενείς με απλή στεάτωση. Η μέση ενεργότητα κασπάσης 3 και κασπάσης 8 ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα σε ασθενείς με φυσιολογικά και με υψηλά επίπεδα ALT. [94]

1.9.2. Αδιποκίνες

Οι κύριες αδιποκίνες που εμπλέκονται στην παθογένεση του NAFLD περιλαμβάνουν την αδιπονεκτίνη, τη ρεζιστίνη, την βισφατίνη, στον TNFα και την IL6.

Τα επίπεδα αδιπονεκτίνης στην κυκλοφορία σχετίζονται αρνητικά με την ανοχή στην ινσουλίνη, στον διαβήτη τύπου II και τη δυσλιπιδαιμία. Αποτελέσματα πολλών μελετών και μετά-αναλύσεων κατατάσσουν την αδιπονεκτίνη στους βιοδείκτες της επιδείνωσης της NAFLD σε NASH, καθώς τα επίπεδα της έχουν βρεθεί επανειλημμένως στατιστικά σημαντικότερα στη NASH. Επιπροσθέτως τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ήταν μειωμένα σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με ασθενείς με άλλες ηπατικές παθήσεις. [95] Η NASH έχει συσχετισθεί με αύξηση της έκφρασης του mRNA του υποδοχέα αδιπονεκτίνης APO2, η οποία συσχετίστηκε και με την απόπτωση των ηπατοκυττάρων. Η εξέλιξη του NAFLD σε θανατηφόρα παχυσαρκία σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης των ηπατικών υποδοχέων αδιπονεκτίνης.[96]

Βάσει μεγάλων διακυμάνσεων στα μέσα επίπεδα αδιπονεκτίνης από διάφορες έρευνες, αυτή η αδιποκίνη δεν είναι μόνη της καλός διαγνωστικός βιοδείκτης για NAFLD/NASH. Ωστόσο, ο συχνός έλεγχος των επιπέδων της στον ασθενή είναι καλός δείκτης πρόγνωσης της εξέλιξης της νόσου.

Άλλη σημαντική αδιποκίνη που σχετίζεται με το NAFLD είναι η λεπτίνη, τα επίπεδα της οποίας στο αίμα αντικατοπτρίζουν το ολικό σωματικό λίπος. Τα επίπεδα λεπτίνης είναι υψηλότερα στον πληθυσμό παχύσαρκων παιδιών με NAFLD σε σύγκριση με την υγιή ομάδα ελέγχου, και σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα ίνωσης σε μικρό δείγμα παιδιατρικού NAFLD. Η λεπτίνη του ορού έχει συσχετισθεί επίσης με την ανοχή στην ινσουλίνη. [97] Ένα μοντέλο που συνδυάζει στην μειωμένη αδιπονεκτίνη και την αυξημένη λεπτίνη στον ορό έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του NASH. [98]

Η γκρελίνη (ghrelin) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ενεργειακό ισοζύγιο και έχει ιδιότητες αδιποκίνης. Τα επίπεδα της σχετίζονται αρνητικά με την ανοχή στην ινσουλίνη και την υπερινσουλιναίμία, και συμβάλουν στο μηχανισμό ανάδρασης μέσω του οποίου ρυθμίζεται το σωματικό βάρος. Χαμηλά επίπεδα γκρελίνης έχουν βρεθεί σε διαβητικά παιδιά, το οποίο μπορεί να αποτελεί μηχανισμό άμυνας έναντι της υπεργλυκαιμίας. [99]

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης πρόσδεσης της ρετινόλης 4 (retinol binding protein 4; RBP4), μιας άλλης αδιποκίνης που σχετίζεται με την ανοχή στην ινσουλίνη, βρέθηκαν να είναι υψηλότερα σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με την υγιή ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα αδιπονεκτίνης και ρεζιστίνης συσχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα λεπτίνης και RBP4). [100]

Βάσει των παραπάνω ευρημάτων μπορεί να θεωρηθεί πως η αδιπονεκτίνη, η ρεζιστίνη, η γκρελίνη και η RBP4 μπορούν να είναι ικανοί βιοδείκτες για τη NAFLD ή το μεταβολικό σύνδρομο, αλλά δεν είναι πιθανό να είναι διαγνωστικοί βιοδείκτες από μόνοι τους.

1.9.3. Κυτοκίνες και βιοδείκτες φλεγμονής

Κυτοκίνες και χημοκίνες της φλεγμονής που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση NAFLD και NASH περιλαμβάνουν τον TNFα, την IL6, τη χημοτακτική πρωτεΐνη 1, καθώς και την C δραστική πρωτεΐνη υψηλής ευαισθησίας (high-sensitivity C-reactive protein). Καταστολή της σηματοδότησης των κυτοκινών ρυθμίζει αρνητικά τους ηπατοκυτταρικούς υποδοχείς ινσουλίνης και προάγει την ανοχή στην ινσουλίνη. [101]

Οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες TNFα και IL6 αυξάνονται στο πλάσμα ασθενών με NASH, σε σύγκριση με αυτούς που πάσχουν από NAFLD χωρίς φλεγμονή. Πολλές μελέτες δείχνουν στενή συσχέτιση μεταξύ IL6 και NASH. [102] Σε πιλοτική μελέτη, ασθενείς με NASH ακολούθησαν ειδική δίαιτα με βιταμίνη E και άσκηση. Σε αυτούς τα επίπεδα IL6 στο πλάσμα ήταν σημαντικά υψηλότερα και μειώθηκαν κατά την πρόοδο της θεραπείας. [102] Αυξημένα επίπεδα εμφανίζει όχι μόνο η ίδια η κυτοκίνη αλλά και ο διαλυτός υποδοχέας της στη NASH σε σύγκριση με την απλή στεάτωση. [103] Σε καμία από αυτές τις δύο μελέτες δεν εξακριβώθηκε ένα κατώφλι για το διαχωρισμό NASH και απλής στεάτωσης. Σε τρίτη πιλοτική μελέτη, παχύσαρκοι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα τα ιστολογικά τους ευρήματα (μη-NASH, πιθανό NASH και NASH). Τα επίπεδα IL-6 μπορούσαν να συσχετιστούν με τον βαθμό στεάτωσης έως το σημείο που οι ασθενείς συμπλήρωναν τα κριτήρια για NASH, όπου η συγκέντρωση της IL6 στο πλάσμα μειωνόταν. Πολυπαραμετρική λογιστική συσχέτιση ανέδειξε την IL6 ως ανεξάρτητο δείκτη πρόβλεψης στεάτωσης αλλά όχι NASH. [104] Αξίζει να σημειωθεί πως, η IL6 αυξάνεται σε διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η ανοχή στην ινσουλίνη, και πυροδοτεί την ίνωση σε διάφορα όργανα. Η IL6 δεν σχετίζεται μόνο με τη φλεγμονή και την απόκριση σε μολύνσεις, αλλά μπορεί να έχει και αντι-φλεγμονώδη δράση καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση μεταβολικών, αναγεννητικών και νευρωνικών διεργασιών.

Τα επίπεδα του TNFα αυξάνονται σημαντικά στη NASH, ωστόσο αυξάνονται και σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως ο καρκίνος και οι μολύνσεις. Μελέτη έδειξε πως ασθενείς με NASH εμφάνισαν

σημαντικά υψηλότερα επίπεδα TNFα στον όρο, καθώς και του διαλυτού υποδοχέα του sTNFR1, σε σχέση με αυτούς με απλή στεάτωση, αλλά δεν κατάφεραν να ορίσουν μια τιμή ως κατώφλι διαχωρισμού. [103] Άλλη μελέτη έδειξε επίσης αύξηση της έκφρασης του mRNA του TNFα σε ασθενείς με NASH σε σχέση με υγιή ομάδα ελέγχου. Οι συγγραφείς πρότειναν ως τιμή κατώφλι για την πρόβλεψη NASH τα 100ng/mL. [105] Ο ρόλος του TNFα στη NAFLD υποστηρίζεται και από τα ευεργετικά αποτελέσματα της πεντοξυφυλλίνης, ενός ανταγωνιστή του TNFα, στα βιοχημικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά της NASH. [106]

Τα επίπεδα της CRP αυξάνονται σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με υγιή άτομο ίδιου δείκτη μάζας σώματος και ηλικίας, και συνεπώς θεωρείται ανεξάρτητος παράγοντας επικινδυνότητας για NAFLD. [107] Είναι ακόμα υπό διερεύνηση το αν η CRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό NASH και απλής στεάτωσης. Για παράδειγμα, τα επίπεδα hs-CRP ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με NASH σε σχέση με αυτούς με στεάτωση σε πληθυσμό Ιαπώνων. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα της hs-CRP ήταν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς NASH με προχωρημένη ίνωση σε σχέση με αυτούς με ήπια ίνωση. Ωστόσο δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων hs-CRP του ορού και του βαθμού στεάτωσης ή νεκρο-φλεγμονής. [108] Συνεπώς, η CRP μπορεί να είναι δείκτης ηπατικής στεάτωσης, αλλά δεν αντικατοπτρίζει τη βαρύτητα της NAFLD.

Η πεντραξίνη 3 (pentraxin 3; PTX3) αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως δείκτης της οξείας φάσης της φλεγμονώδους απόκρισης. Σχετίζεται δομικά αλλά διαχωρίζεται από τα κλασσικά μέλη της οικογένειας των πεντραξινών, όπου ανήκει και η CRP. Οι Yoneda et al. ανακάλυψαν πρώτοι πως τα επίπεδα της PTX3 ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με αυτούς με απλή στεάτωση ή τον υγιή πληθυσμό. Παρατηρήθηκε επίσης βαθμιαία αύξηση των επιπέδων της ανάλογα με την αύξηση του βαθμού ηπατικής ίνωσης. Ωστόσο τα επίπεδα της δεν συσχετίζονται με την ηπατική στεάτωση ή το βαθμό νεκρο-φλεγμονής. [109]

Αύξηση της φερριτίνης αλλά φυσιολογικά επίπεδα κορεσμού της τρανσφερίνης εντοπίζεται συχνά σε ασθενείς με ηπατική στεάτωση. Η διαταραχή σιδήρου και γλυκόζης ή/και μεταβολισμού των λιπιδίων, στις περισσότερες περιπτώσεις σχετίζεται με την ανοχή στην ινσουλίνη, είναι υπεύθυνη για την υπερφερριτιναιμία και αναγνωρίζει ασθενείς με επικινδυνότητα ανάπτυξης NASH. [110] Σε πρόσφατη μελέτη, επίπεδα ορού της φερριτίνης 1,5 φορές υψηλότερα του φυσιολογικού επιπέδου συσχετίστηκαν με την ηπατική μετατόπιση σιδήρου και τη διάγνωση της NASH, και δυσχέραιναν την ιστολογική εικόνα. Οι συγγραφείς πρότειναν πως η φερριτίνη του ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση ασθενών NAFLD με προδιάθεση για ανάπτυξη NASH. [111]

1.9.4. Βιοδείκτες ηπατικής ίνωσης – συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας

Η ηπατική ίνωση είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της NASH. Τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας είναι αναμενόμενο να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια σχηματισμού ίνωσης στο ήπαρ. Είναι άρα λογική η χρήση τέτοιου βιοδεικτών για το διαχωρισμό NASH, απλής στεάτωσης, και κυρίως ίνωσης.

Στενή συσχέτιση έχει βρεθεί μεταξύ NASH, διαβήτη και ίνωσης σε μεγάλο δείγμα παχύσαρκων ασθενών. Πολλοί μη επεμβατικοί βιοδείκτες ίνωσης έχουν χρησιμοποιηθεί στη NAFLD, συμπεριλαμβανομένων των: βαθμονόμηση ίνωσης NAFLD (NAFLD fibrosis score), δείκτης του λόγου AST/αιμοπεταλίων, βαθμονόμηση FIB-4 (FIB-4 score) και βαθμονόμηση BARD (BARD score). Αυτοί οι δείκτες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση ασθενών μεγάλης επικινδυνότητας ανάπτυξης ηπατικών επιπλοκών και θανάτου. Δεν μπορούν επίσης να συσχετισθούν άμεσα με το βαθμό στεάτωσης ή την παρουσία NAFLD/NASH, υποδηλώνοντας την ανάγκη ύπαρξης μη επεμβατικών μεθόδων και βιοδεικτών για την πρόγνωση της νόσου. Ωστόσο και τα τέσσερα διαγνωστικά εργαλεία έχουν καλή αρνητική διαγνωστική αξία αλλά χαμηλή θετική αξία πρόβλεψης, και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον αποκλεισμό της ίνωσης σε ασθενής με NAFLD, βοηθώντας να αποφευχθεί η βιοψία. [101]

Οι Yoneda et al. ανέφεραν αύξηση του υαλουρονικού οξέος και του τομέα 7S του κολλαγόνου τύπου IV, συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, σε ασθενείς με NASH με προχωρημένη ίνωση σε σύγκριση με αυτούς με ήπια ίνωση. Τα επίπεδα υαλουρονικού οξέος ήταν επίσης αυξημένα στους ασθενείς με NASH σε σύγκριση με αυτούς με απλή στεάτωση. Ωστόσο δεν διατύπωσαν κάποια τιμή-κατώφλι για το διαχωρισμό των διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. [109] Άλλη μελέτη προσδιόρισε συγκεκριμένες τιμές για τον εντοπισμό της NASH μέσω ανάλυσης ROC, αλλά ανέφερε πως βαριάς μορφής ηπατική ίνωση δεν μπορεί να υπάρχει αν η έκφραση και των δύο αυτών συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας είναι κάτω από το κατώφλι. [112] Άλλη μελέτη που συμπεριέλαβε μόνο ασθενείς με NASH, έδειξε σημαντικά αυξημένα επίπεδα υαλουρονικού οξέος και λαμινίνης στον ορό ανάμεσα σε αυτούς με ηπατική ίνωση και αυτούς χωρίς. Το συμπέρασμα αυτής ήταν πως το υαλουρονικό οξύ μπορεί να είναι παράγοντας πρόβλεψης της παρουσίας και του βαθμού ηπατικής ίνωσης στη NASH. Αντίθετα, η λαμινίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση ηπατικής ίνωσης αλλά δεν έχει καμία αξία στην πρόβλεψη του βαθμού αυτής. [113]

Σε αντίθεση με αυτούς, άλλη έρευνα διατύπωσε πως δεν υπάρχει διαφορά των επιπέδων δεικτών ηπατικής ίνωσης όπως το υαλουρονικό οξύ, TIMP1, το κολλαγόνο τύπου IV και YKL-40 ανάμεσα σε ασθενής με NASH και απλή στεάτωση. Το προ-κολλαγόνο III ήταν το μόνος δείκτης που συσχετίστηκε

με τη κλίμακα βαθμονόμησης της NAFLD, και μπορούσε να διαχωρίσει ασθενείς με απλή στεάτωση από ασθενείς με NASH ή αυξημένη ίνωση. [114]

Μελέτη έδειξε δυνατή συσχέτιση ανάμεσα στον TGFβ και τα στάδια ίνωσης. Ωστόσο, σε ασθενείς με κίρρωση, αυτός ο δείκτης μειώνεται σημαντικά λόγω μείωσης του αριθμού των αστεροειδών κυττάρων. [115]

1.9.5. Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες

Στενή συσχέτιση έχει βρεθεί ανάμεσα στους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και στην ανοχή στην ινσουλίνη σε ασθενείς με NAFLD. Το οξειδωτικό στρες, που εκδηλώνεται ως υψηλότερα επίπεδα δραστικών ριζών καρβονυλίων στο αίμα, μπορεί να είναι άμεσος παράγοντας επικινδυνότητας για την εμφάνιση NAFLD.

Το CYP2E1 είναι ένζυμο με προ-οξειδωτικές ιδιότητες και εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπαρών οξέων, που οδηγεί στο σχηματισμό τοξικών υπεροξειδίων των λιπιδίων. Πρόσφατη έρευνα έδειξε πως η υπεροξείδωση των λιπιδίων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε βιοψίες ασθενών με παιδιατρικό NAFLD σε αντίθεση με ασθενείς με φυσιολογικό ηπατικό ιστό, χωρίς σημαντική διαφορά στην έκφραση του CYP2E1. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και του CYP2E1 ήταν συγκρίσιμα μεταξύ ασθενών με απλή στεάτωση και με NASH. Έτσι, το CYP2E1 μπορεί να είναι υπεύθυνο για την υπερπαραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, που είναι σημαντικό για την εξέλιξη του NAFLD σε NASH. Επίσης υψηλότερη ενεργότητα του CYP2E1 μπορεί να είναι προσαρμοστικός μηχανισμός έναντι της υπερφόρτωσης λιπιδίων. Πρόσφατα ευρήματα αναφέρουν πρόσθετη συσχέτιση του ενζύμου με την υπερπαραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, τη μιτοχονδριακή συναρμολόγηση δραστικών ριζών οξυγόνου και της ανοχής στην ινσουλίνη. [101]

1.9.6. Ομικές τεχνολογίες και βιοδείκτες

1.9.6.1. Genomics

Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εύρεση συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών στην παθολογία της NAFLD. Αυτές οι μελέτες έχουν καταφέρει να αναγνωρίσουν βιοδείκτες στεάτωσης σε διάφορα γονιδιώματα. Μεταλλαγή στην φωσφολιπάση PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing family member A3), στο χρωμόσωμα 22, έχει συσχετισθεί στενά με αυξημένα επίπεδα λίπους στο ήπαρ και ηπατική φλεγμονή σε ασθενείς με στεάτωση. Αυτή η μεταλλαγή συσχετίζεται φαινοτυπικά με στεάτωση, με φλεγμονή των ηπατικών φλεβών και φλεγμονή των ηπατικών λοβών, με σχηματισμό υαλωδών σωματίων Mallory και ίνωση, αλλά και με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε ασθενείς με NAFLD. [116]

Πρόσφατα, πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου στο μέλος 2 της διαμεμβρανικής υπεροικογένειας πρωτεϊνών 6 (transmembrane 6 superfamily member 2), ένα γονίδιο γνωστής λειτουργίας στο χρωμόσωμα 19, συνδέθηκε με την ανάπτυξη NAFLD. [117]

Είναι γνωστό πως ο υποδοχέας TLR4 (toll-like receptor 4) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της NAFLD. Παρουσιάζει ενδιαφέρον ωστόσο, πως αλληλικές παραλλαγές αυτού του υποδοχέα (π.χ. Asp299Gly και Thr399IleTLR4) στον άνθρωπο μπορεί να προλαμβάνουν το NAFLD, καθώς ο αριθμός ατόμων με την ετερόζυγη μεταλλαγή Asp299Gly είναι σημαντικά χαμηλότερος σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. [118]

Πολυμορφισμός στον SREB-1c (sterol regulatory element-binding factor 1c) αυξάνει την επικινδυνότητα ανάπτυξης NAFLD με πιο σοβαρή ηπατική ιστολογική εικόνα και διαταραχή στο μεταβολισμό γλυκόζης και λιποπρωτεϊνών. [119]

Μια κοινή παραλλαγή στο ρυθμιστικό γονίδιο της γλυκοκινάσης και ο MTP-493G>T βρέθηκε να συσχετίζεται με υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης NAFLD, μαζί με βαριάς μορφής ηπατική ίνωση και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό. [120]

Τέλος οι γονοτυπικοί πολυμορφισμοί θυμίνης-κυτοσίνης, κυτοσίνης-κυτοσίνης και θυμίνης-θυμίνης της απολιποπρωτεΐνης C3 είναι πιο ευαίσθητοι στην ανάπτυξη NAFLD. [121]

1.9.6.2. Transcriptomics

Οι μελέτες του μεταγραφώματος (transcriptomics) αφορούν την γονιδιακή έκφραση στο επίπεδο του mRNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση και το χαρακτηρισμό μεταγραφικών χαρακτηριστικών των ασθενειών. Το κυριότερο εργαλείο σε αυτές τις μελέτες είναι οι μικροσυστοιχίες (microarrays).

Με τη χρήση αυτής της τεχνολογίας, γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, όπως το CYP4A14, και τη κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, όπως παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών 21 (fibroblast growth factor 21) και το CYP4A10, έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται σε ICR ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε VPA. Αντίθετα, γονίδια που κωδικοποιούν για την γλυκόζη-6-φωσφατάση και την πρωτεϊνική φωσφατάση 2, και τη ρυθμιστική υπομονάδα B,δ και α πρωτεΐνης που σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη υποεκφράζονται. [122]

Ομοίως, σε C57BL/6 ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε tamoxifen, υπερεκφράστηκαν ο υποδοχέας ανδρογόνων, το μέλος 1 της ομάδας F της υπο-οικογένειας 2 πυρηνικών υποδοχέων (nuclear receptor

subfamily 2 group F member 1), ο ηπατοκυτταρικός πυρηνικός παράγοντας α 4 (hepatocyte nuclear factor α 4) και ο υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος 1 α (retinoic acid receptor-related orphan receptor 1 α), που όλα σχετίζονται με το μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων. [123]

Επιπροσθέτως, ποντίκια ICR στα οποία χορηγήθηκε τετρακυκλίνη, έδειξαν υπερέκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό φωσφολιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της κινάσης 1 της χολίνης, γονιδίων που σχετίζονται με την επιμίκηση της αλυσίδας λιπαρών οξέων και γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων. [124]

Ανάλυση μεταγραφώματος ηπατικού ιστού ποντικών στον οποίο έλειπε η απολιποπρωτεΐνη E και ακολουθούσαν δυτικού τύπου δίαιτα πλούσια σε λινολεϊκό οξύ, έδειξε υπερέκφραση του αντιγόνου 6D των λεμφοκυττάρων, γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, της λιπο-ειδικής πρωτεΐνης 27 (fat-specific protein 27), γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό λιπαρών οξέων, όπως το CD36 και η αποκορεστάση 1 του στεαροϋλ-CoA (stearoyl-CoA desaturase-1). Αντίθετα έδειξαν συνακόλουθη υπο-έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση χολικών οξέων, όπως το CYP7B1, όπως και γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση στερεοειδών ορμονών. [125]

Η ντεκορίνη (decorine), μια πρωτεογλυκάνη που παράγεται από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα σε περιοχές με φλεγμονή, υπερεκφράζεται σε παχύσαρκους ασθενείς. Αυτό υποδηλώνει τον πιθανό της ρόλο στην ανάπτυξη φλεγμονής στη NASH. Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από την παρατήρηση πως η έκφραση της αυξάνεται σε παχύσαρκα και C57BL/6J ποντίκια που ακολουθούσαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Αλλά γονίδια που υπερεκφράστηκαν είναι της ενδοθηλιακής μεμβρανικής πρωτεΐνης 1, της περιφερειακής πρωτεΐνης μυελίνης που ρυθμίζει την κυτταρική μήτρα και την αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου, και της κινάσης IκB-β πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης (IκB kinase β-interacting protein) που συνδέει τον NF-κB στο αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μείωση της τελευταίας μειώνει την έκφραση των κυτοκινών, υποδηλώνοντας προστατευτικό ρόλο έναντι της ανοχής στην ινσουλίνη. [126]

Οι φωσφατάσες τυροσίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δράσης της ινσουλίνης και τον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης. Ποντίκια χωρίς την φωσφατάση τυροσίνης 6 τα οποία ακολούθησαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, προστατεύονται από την ανοχή στη γλυκόζη αλλά είναι πιο ευαίσθητα στην ηπατική στεάτωση και υπερεκφράζουν το γονίδιο της PPARγ. [127]

Ηπατικός ιστός από ασθενείς με στεάτωση βρέθηκε να υπερεκφράζει το εξελικτικά συντηρημένο ενδιάμεσο του μονοπατιού Toll (μιας προσαρμοστικής πρωτεΐνης του σηματοδοτικού μονοπατιού Toll-like και ιντερλευκίνης 1 που σχετίζονται με τη συναρμολόγηση του μιτοχονδριακού NAD), της πρωτεΐνης

που αλληλεπιδρά με την Toll και της ανοσοσφαιρίνης που σχετίζεται με την ιντερλευκίνη 1. Αυτή η υπερέκφραση μπορεί να αποδοθεί στην ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer ή στην απελευθέρωση ιντερλευκινών από τα ηπατοκύτταρα που επιδρούν στα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα. [128]

Τέλος το mRNA της κυτταροσκελετικής κερατίνης τύπου 1, πρωτεΐνης που σχετίζεται με το μεταβολισμό, και του μέλους B10 της οικογένειας αλδο-κετο-ρεδουκτάσης 1, πρωτεΐνης που σχετίζεται με την αρχιτεκτονική του κυττάρου, υπερεκφράζονται στην στεατοηπατίτιδα σε σχέση με την απλή στεάτωση ή το φυσιολογικό ήπαρ. Συνεπώς έχουν προταθεί ως πιθανοί βιοδείκτες τόσο για την στεατοηπατίτιδα όσο και για την εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. [129]

1.9.6.3. Proteomics

Συγκριτικά με το γονιδίωμα, το πρωτέωμα μπορεί να προσφέρει μια πιο δυναμική και ακριβή εικόνα τόσο του ενδογενούς γονιδιακού προφίλ του κυττάρου όσο και της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων σε αυτό. Οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση δεν είναι πάντα ικανές να προβλέψουν επακριβώς τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης, γιατί οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση. Πρωτεομικές τεχνικές, όπως η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας και η ELISA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη αλλαγών σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε μεγάλο κλίμακα.

Πρωτεομική ανάλυση έδειξε πως το μεταβολικό προφίλ διαφέρει ανάλογα το επίπεδο παχυσαρκίας κάθε ασθενή. Αυτή η ανάλυση ήταν χρήσιμη για το διαχωρισμό στεάτωσης από στεατοηπατίτιδα σε ασθενής με διαγνωσμένο μέσω βιοψίας NAFLD. [130]

Διαφορετική πρωτεομική ανάλυση κατάφερε να κατηγοριοποιήσει το πρωτεομικό προφίλ του ορού ασθενών με NAFLD. Η υπομονάδα α της αιμογλοβίνης βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα υψηλά επίπεδα αιμογλοβίνης κατάφεραν να προβλέψουν την επικινδυνότητα εμφάνισης NAFLD κατά τη διάρκεια τριών ετών σε μεγάλο δείγμα υγιών αρχικά ατόμων. [131]

Χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές πρωτεομικές τεχνικές οι Miller et al. Εντόπισαν διάφορες πρωτεΐνες που υποεκφράζονται ή υπερεκφράζονται στη NAFLD. Από αυτές, η αφαμίνη, η απολιποπρωτεΐνη E, η CD-5, το συμπλήρωμα C3, η πρωτεΐνη πρόσδεσης 3 του αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης (insulin growth factor binding protein 3), η πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D και η λεμφοκυτταρική κυτοσολική πρωτεΐνη 1 βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στον ορό ασθενών με NAFLD. Επιπροσθέτως, η απολιποπρωτεΐνη E, η καταλάση, ο CD-5, η πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D και η λεμφοκυτταρική

κυτοσολική πρωτεΐνη 1 υπερεκφράζονται σε ασθενείς με NASH σε σύγκριση με αυτούς με απλή στεάτωση. [132]

Χρησιμοποιώντας τέτοιες τεχνικές έχει βρεθεί πως ποντίκια που ακολούθησαν δίαιτα πλούσια σε φρουκτόζη παράγουν σε αφθονία πολλές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης πρόσδεσης λιπαρών οξέων (fatty acid binding protein), τη συνθάση του καρβομούλ-φωσφορικού (carbamoyl-phosphate synthase), της απολιποπρωτεΐνης A1 (apolipoprotein A1), της πρωτεϊνικής δισουλφιδικής ισομεράσης (protein disulfide isomerase), αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών, της 1,6-δι-δωσφορικής φρουκτόζης και της κινάσης της γλυκερόλης. [132]

1.9.6.4. Metabolomics

Ανάμεσα στις ομικές τεχνολογίες, η μεταβολομική είναι η πιο σταθερή και πιο αντιπροσωπευτική για τη μελέτη του φαινοτύπου καθώς αντικατοπτρίζει όλες τις κυτταρικές λειτουργίες. Οι κύριες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική είναι η φασματομετρία μάζας και η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Μεταβολομική ανάλυση έδειξε πως η NAFLD σχετίζεται με υψηλότερες συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης και ολικής κυστεΐνης, και χαμηλότερες συγκεντρώσεις ολικής γλουταθειόνης στο πλάσμα ασθενών με ηπατική στεάτωση και NASH σε σχέση με υγιή ομάδα ελέγχου. Υψηλότερα επίπεδα γλυκοχολικού, ταυροχολικού και γλυκο-ξενο-δεοξυχολικού παρατηρήθηκαν επίσης σε ασθενείς με NAFLD. Συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας ήταν χαμηλότερες στο πλάσμα ασθενών με NASH, ενώ οι συγκεντρώσεις ελεύθερης καρνιτίνης, βουτυρυλ-καρνιτίνης και μεθυλ-βουτυρυλ-καρνιτίνης ήταν υψηλότερες. [133]

Πρόσφατα, έρευνα αναγνώρισε τα επίπεδα γλυκόζης, γλουταμικού, λακτικού και ταυρίνης του ορού ως βιοδείκτες για τη NAFLD, και κατασκεύασαν ένα μοντέλο πρόβλεψης διαφόρων σταδίων της NAFLD βάσει αυτών των βιοδεικτών σε κάθε ασθενή. [134]

1.10. Σκοπός της έρευνας

Παρά την αυξημένη εμφάνιση της στον πληθυσμό, τα αίτια και οι μηχανισμοί εξέλιξης της NAFLD δεν είναι επαρκώς κατανοητά. Μέχρι στιγμής η μόνη θεραπεία αφορά τη σωστή διατροφή και άσκηση και δεν υπάρχει υπάρχει εγκεκριμένη από τον FDA θεραπεία. Παράλληλα δεν υπάρχουν επαρκή *in vitro* μοντέλα για τη μελέτη τόσο των μοριακών μηχανισμών, όσο και πιθανών θεραπευτικών στόχων. Οι έρευνες τα

τελευταία χρόνια έχουν στραφεί σε multi-omic τεχνικές, αλλά δεν υπάρχει έρευνα –εν γνώσει μας- που να εξετάζει τη νόσο σε επίπεδο σηματοδότησης σήματος, τη στιγμή που οι φωσφοπρωτεομικές μετρήσεις ανάγονται σε σημαντικό εργαλείο στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η *in vitro* επαγωγή της NAFLD σε νέα *in vitro* μοντέλα πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων, μέσω έκθεσης αυτών σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και φαρμακολογικούς παράγοντες, με σκοπό να μελετηθεί το πρωτεομικό προφίλ του μηχανισμού της νόσου.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2. 1. Καλλιέργεια Κυττάρων

Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα απομονώθηκαν από δείγματα βιοψίας ενήλικων ασθενών (Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ProtaVio Ltd) με διπλή αιμάτωση και διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο σύμφωνα με πρωτόκολλα της Biopredic International (Saint-Gregoire France).

Τα κύτταρα παγολύθηκαν και επιστρώθηκαν, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Biopredic International, σε 96-well plates (Corning® Costar®, 3599) επιστρωμένες με Rat Tail Collagen I (BD Biosciences) σε πυκνότητα 50000 κύτταρα/well σε θρεπτικό υλικό Williams' E με GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, 32551020) με προσθήκη 10% v/v Fetal Bovine Serum (Biosera, FB-1001/500), 10% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco Life Technologies, 15140122) και 1 µg/mL ινσουλίνη (Gibco Life Technologies, 12585014).

2. 2. Επαγωγή Μη Αλκοολικής Λιπώδης Νόσου του Ήπατος

Η επαγωγή της Μη Αλκοολικής Λιπώδης Νόσου του ήπατος έγινε με κατεργασία των κυττάρων με μείγμα ολεικού και παλμιτικού οξέος (Cayman Chemicals, 90260, 10006627), Tamoxifen citrate (Cayman Chemicals, 11629), Amiodarone hydrochloride (Cayman Chemicals, 15213), Tetracycline hydrochloride (Cayman Chemicals, 14328) και Valproic Acid sodium salt (Cayman Chemicals, 13033).

Για κάθε ουσία προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων στον διαλύτη της, και η βιωσιμότητα των κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της, με τη μέθοδο Resazurin, με σκοπό τον προσδιορισμό υποτοξικών συγκεντρώσεων. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν καμπύλες δόσης – βιωσιμότητας. Για την κατασκευή των *in vitro* μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις που δεν μειώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων κάτω από 80% (EC₈₀).

Ο υπολογισμός των υποτοξικών συγκεντρώσεων έγινε με χρήση μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης 4 παραμέτρων, με χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 6.0.

Κατεργασία με μείγμα ολεικού και παλμιτικού οξέος

Τα λιπαρά οξέα διαλύθηκαν σε 100% αιθανόλη σε θερμοκρασία 90°C, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Παρασκευάστηκε μείγμα ολεικού και παλμιτικού οξέος σε μοριακή αναλογία 1:2 παλμιτικό οξύ:ολεικό οξύ. Τα κύτταρα εκτέθηκαν για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 και 1000 µM) του μείγματος σε 1% v/v στο θρεπτικό υλικό.

Η συγκέντρωση αλβουμίνης είναι σημαντικός παράγοντας στον προσδιορισμό των διαθέσιμων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Συνεπώς τα ελεύθερα λιπαρά οξέα συμπλοκοποιήθηκαν με αλβουμίνη σε αναλογία 4:1 λαμβάνοντας υπόψιν την ήδη υπάρχουσα συγκέντρωση πρωτεΐνης στο θρεπτικό υλικό.

Κατεργασία με Tamoxifen citrate, Amiodarone hydrochloride, Tetracycline hydrochloride, Valproic Acid sodium salt

Οι φαρμακολογικές ουσίες Tamoxifen citrate, Amiodarone hydrochloride, Tetracycline hydrochloride διαλύθηκαν σε DMSO σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ουσιών για 24 ώρες σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα σε 0,1% v/v στο θρεπτικό υλικό (Πίνακας 2.1).

Δραστική Ουσία	Συγκέντρωση (μM)
Tamoxifen citrate	2, 3, 4, 5, 6, 8, 10
Amiodarone hydrochloride	2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30
Tetracycline hydrochloride	20, 100, 200, 250, 300, 350, 400

Πίνακας 2.1

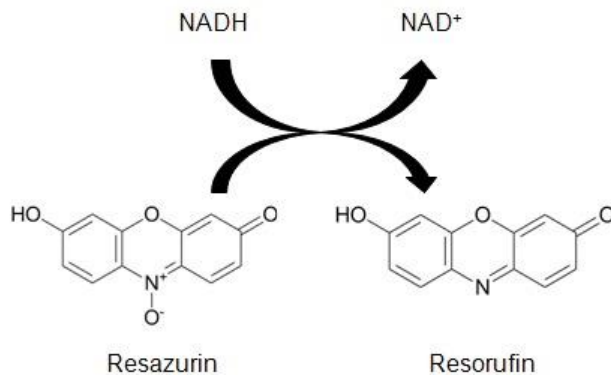
Το Valproic Acid sodium salt διαλύθηκε σε 100% αιθανόλη σε θερμοκρασία 90°C, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις για 24 ώρες σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα σε 1% v/v στο θρεπτικό υλικό (Πίνακας 2.2).

Δραστική Ουσία	Συγκέντρωση (mM)
Valproic Acid sodium salt	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

Πίνακας 2.2

2. 3. Μέθοδος Resazurin για τη μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας – Καμπύλες δόσης-επιβίωσης

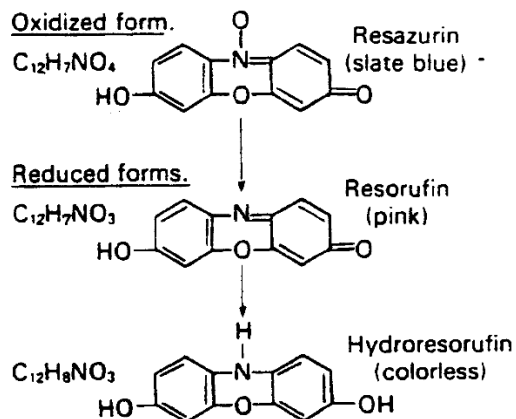
Το resazurin είναι ένας κυτταρικά διαπερατός οξειδοαναγωγικός δείκτης των κυττάρων που χρησιμοποιείται για την μέτρηση του αριθμού βιώσιμων κυττάρων (Εικόνα 2.1). Μπορεί να διαλυθεί σε φυσιολογικούς διαλύτες (π.χ. PBS) σχηματίζοντας ένα σκουρο μπλε διάλυμα, και να προστεθεί απευθείας σε κυτταροκαλλιέργειες με ομογενή τρόπο. Ζωντανά κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό μπορούν να ανάγουν το resazurin στο ροζ και φθορίζον resofurin.



Εικόνα 2.1 Δομή του υποστρώματος resazurin και του ροζ φθορίζοντος προϊόντος resorufin (ThermoFisher Scientific)

Δεν απαιτείται προσθήκη ενός ενδιάμεσου φορέα ηλεκτρονίων για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, αλλά η προσθήκη θα μπορούσε να επιταχύνει την αντίδραση. Η ποσότητα resorufin που παράγεται είναι ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων και να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση φθορισμού σε μήκος κύματος διέγερσης 560nm και μήκος κύματος εκπομπής 590nm. Ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει και με μέτρηση οπτικής απορρόφησης, αλλά παρουσιάζει πολύ μικρότερη ευαισθησία.

Ο χρόνος επώασης που απαιτείται για την παραγωγή επαρκούς φθορίζον σήματος είναι συνήθως 1-4 ώρες και εξαρτάται από την μεταβολική ενεργότητα του κάθε κυτταρικού τύπου, της πυκνότητας των κυττάρων και των συνθηκών καλλιέργειας, όπως το θρεπτικό υλικό. Ο χρόνος επώασης πρέπει συνεπώς να προσδιορίζεται πειραματικά και να είναι αρκετά μικρός ώστε να αποφευχθεί η τοξικότητα του αντιδραστηρίου αλλά αρκετά μεγάλος ώστε να είναι αρκετή η ευαισθησία της μεθόδου. Περαιτέρω αναγωγή του resorufin οδηγεί σε σχηματισμό hydroresorufin, το οποίο είναι άγχρωμο και μη-φθορίζον, και συνεπώς μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Πορεία αναγωγής του resazurin σε resorufin και hydroresorufin (ThermoFisher Scientific)

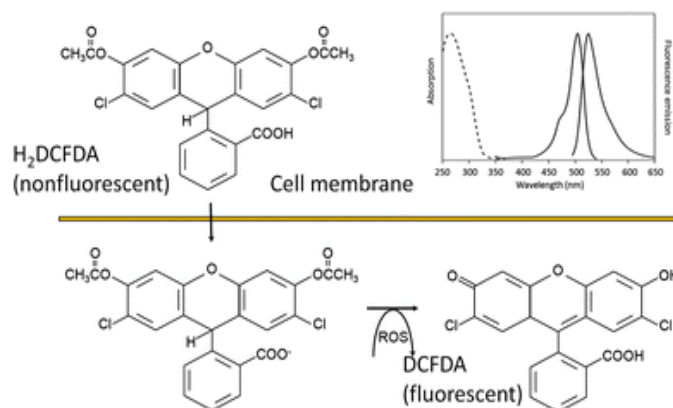
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε Resazurin sodium salt (SIGMA, R7017) διαλυμένο αρχικά σε Dulbecco's Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (Biosera, PM-B2092), και περεταίρω αραιωμένο σε θρεπτικό υλικό πριν από κάθε πείραμα. Μετά από την 24ωρη έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες, αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε Resazurin 60μg/mL. Έγινε επώαση για 2 ώρες σε επωαστήρα 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία και μετρήθηκε ο φθορισμός σε μήκη κύματος Ex560nm/Em590nm στο Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific™). Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε ως ποσοστό των εκτεθειμένων στις επαγωγικές ουσίες κυττάρων προς τα μη εκτεθειμένα. [135]

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή καμπύλης δόσης-επιβίωσης για τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της NAFLD, με σκοπό να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις που δεν μειώνουν τη βιωσιμότητα κάτω από 90%. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 6.0.

2. 4. Μέτρηση παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)

Η ενδοκυτταρική παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) έγινε με χρήση του κυτταρικά διαπερατού φθορίζοντος υποστρώματος CM-H₂DCFDA (ThermoFisher Scientific, C6827).

Ο CM-H₂DCFDA μεταφέρεται παθητικά στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου οι ομάδες οξικού άλατος διασπώνται από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες και η θειο-ενεργή χλωρομεθυλική ομάδα αντιδρά με την ενδοκυτταρική γλουταθειόνη και άλλες θειόλες. Η επακόλουθη οξειδωση δημιουργεί το φθορίζον προϊόν 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) που παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 2.3). Ο φθορισμός του DCFDA μπορεί να μετρηθεί σε μήκος κύματος διέγερσης 492-495nm και μήκος κύματος εκπομπής 517-527nm.



Εικόνα 2.3 Αντίδραση αναγωγής του CM-H₂DCFDA σε DCFDA μέσα στο κύτταρο (ThermoFisher Scientific)

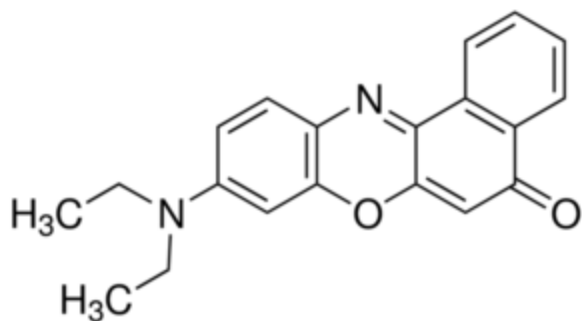
Μετά την έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες για 24 ώρες, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 10μM CM-H₂DCFDA διαλυμένο σε PBS για 15 λεπτά σε επωαστήρα 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία και μετρήθηκε ο φθορισμός σε μήκη κύματος Ex494nm/Em520nm στο Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific™). Ο φθορισμός κανονικοποιήθηκε με την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο δείγμα, που προσδιορίστηκε με την μέθοδο BCA, και εκφράστηκε σε RFU/μg πρωτεΐνης.

Λαμβάνοντας υπόψιν τον αντιοξειδωτικό ρόλο της αλβουμίνης, τα επίπεδα αλβουμίνης διατηρήθηκαν ίδια σε όλα τα δείγματα. Ως θετικοί μάρτυρες παραγωγής ROS χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα εκτεθειμένα σε 400μM H₂O₂ για μισή ώρα. Η βέλτιστη συγκέντρωση του H₂O₂ προσδιορίστηκε με κατασκευή καμπύλης δόσης – βιωσιμότητας, όπου επιλέχθηκε συγκέντρωση που δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

2. 5. High Content Screening των σταγονιδίων λιπιδίων

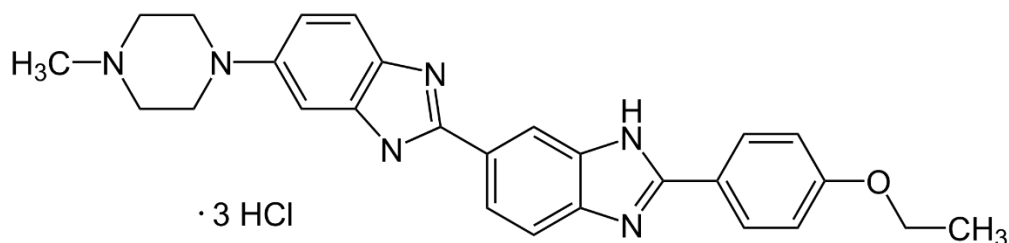
Το ενδοκυτταρικό φορτίο λίπους προσδιορίστηκε με μικροσκοπία φθορισμού μετά από χρώση των ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Nile Red (Thermo Fisher Scientific, N1142). Ως αντιχρωματισμός χρησιμοποιήθηκε η μπλε φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, H3570).

Το Nile Red χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση λιπιδίων, ειδικά ουδέτερων σταγονιδίων λιπιδίων μέσα στο κύτταρο. Είναι σχεδόν μη-φθορίζον στο νερό και σε άλλους πολικούς διαλύτες αλλά φθορίζει σε μη-πολικά περιβάλλοντα σε μήκος κύματος διέγερσης 552nm και μήκος κύματος εκπομπής 636nm. (Εικόνα 2.4)



Εικόνα 2.4 Οργανική δομή Nile Red (ThermoFisher Scientific)

Το Hoechst 33342 είναι κυτταρικά διαπερατή χρωστική που εκπέμπει μπλε φθορισμό όταν προσδεθεί στο dsDNA (μήκος κύματος διέγερσης 392nm και μήκος κύματος εκπομπής 440nm) (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5 Οργανική δομή Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific)

Μετά την έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες για 24 ώρες, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν για 45 λεπτά σε διάλυμα χρώσης αποτελούμενο από Nile Red 2μg/mL και Hoechst 33342 5μg/mL διαλυμένα σε θρεπτικό υλικό. Μετά την επώαση έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, πλύση των κυττάρων με PBS και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού.

Η λήψη των εικόνων έγινε με χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR (Cell History Recorder) (NanoEnTek), με χρήση των καναλιών DAPI (Excitation 390/40, Emission 452/45) και RFP (Excitation 525/50, Emission 580) και 20x οπτικού φακού.

Η ποσοτικοποίηση των σταγονιδίων λιπιδίων έγινε με το ελεύθερο λογισμικό ανάλυσης εικόνων CellProfiler (Carpenter Lab, Broad Institute of Harvard and MIT).

Για την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σειρά εντολών:

1. ColorToGray → μετατροπή εικόνας από RGB σε grayscale
2. CorrectIlluminationCalculate → προσδιορισμός εξίσωσης φωτεινότητας της εικόνας
3. CorrectIlluminationApply → εξομάλυνση φωτεινότητας εικόνων βάση της παραπάνω εξίσωσης
4. IdentifyPrimaryObjects → αναγνώριση πυρήνων βάσει σχήματος, μεγέθους και colour intensity

5. IdentifyPrimaryObjects → αναγνώριση σταγονιδίων λιπιδίων βάσει σχήματος, μεγέθους και colour intensity
6. MeasureObjectIntensity → μέτρηση colour intensity των προσδιορισμένων από τις προηγούμενες εντολές σωμάτων

Τέλος υπολογίστηκε για κάθε δείγμα ο λόγος RFP Intensity/DAPI Intensity. Η στατιστική επεξεργασία έγινε στο χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 6.0.

2. 6. Λύση κυττάρων – Συλλογή πρωτεϊνών

Η λύση του κυττάρου αναφέρεται στη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης συχνά από ιούς, ενζυματικούς παράγοντες ή ωσμωτικούς μηχανισμούς. Στην παρούσα μελέτη η λύση των κυττάρων έγινε με ειδικό διάλυμα απορρυπαντικού (detergent), το οποίο αναφέρεται ως Lysis Buffer (ProtaVio Ltd). Οι πρωτεΐνες αποτελούν προϊόν της λύσης των κυττάρων. Για να προστατευθούν οι πρωτεΐνες από την δράση των ενδοκυτταρικών πρωτεασών χρησιμοποιήθηκε μείγμα αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitors; PI) (ProtaVio Ltd) μαζί με τον αναστολέα πρωτεασών σερίνης Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF; SIGMA, P4626)

Μετά την έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες για 24 ώρες, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε μείγμα Lysis buffer, PMSF και PI και έγινε επώαση στους -80°C για 1 ώρα. Μετά την επώαση τα δείγματα κατεργάστηκαν με υπέρηχους και φυγοκεντρήθηκαν, με σκοπό την απομόνωση του υπερκείμενου που περιέχει τις πρωτεΐνες. Η χαμηλή θερμοκρασία και η κατεργασία με υπέρηχους συμβάλλει στην αποτελεσματική θραύση των κυτταρικών μεμβρανών.

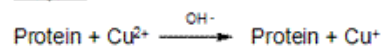
2. 7. Μέθοδος BCA για την μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Η μέθοδος δικινχονικού οξέος ή μέθοδος BCA (bicinchonic acid) είναι μια βιοχημική μέθοδος για τη μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα και είναι παρόμοια με τις μεθόδους Lowry και Bradford. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην χρήση του BCA ως αντιδραστήριο ανίχνευσης Cu^+ , που σχηματίζονται όταν ο Cu^{2+} ανάγεται από τις πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας). Το μωβ προϊόν αυτής της αντίδρασης παράγεται από τη χηλείωση δύο μορίων BCA με ένα ιόν χαλκού Cu^+ . (Εικόνα 2.6) Η αρχή της μεθόδου δηλαδή συνοψίζεται στις παρακάτω αντιδράσεις:

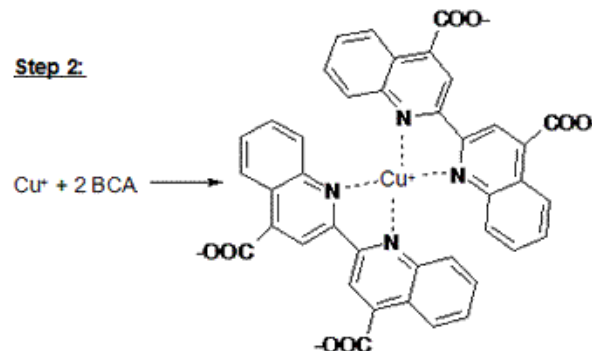
$\text{Protein} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Tetradentate-Cu}^+ \text{ complex (temperature dependent)}$

$\text{Cu}^+ + 2\text{BCA} \rightarrow \text{BCA-Cu}^+ \text{ complex (purple at } A_{562})$

Step 1:



Step 2:



Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης BCA (ThermoFisher Scientific)

Η χρωματογόνο αυτή ένωση παρουσιάζει υψηλή οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 562nm, οποία εμφανίζει γραμμικότητα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σε ένα εύρος συγκεντρώσεων (20-2000 µg/mL). Το χρώμα που δημιουργείται οφείλεται στη μακρομοριακή δομή της πρωτεΐνης, στον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών και στην παρουσία τεσσάρων συγκεκριμένων αμινοξέων (κυστεΐνη, κυστίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη). Στη μέθοδο BCA η αντίδραση δεν φτάνει σε ένα τελικό σημείο, δηλαδή το χρώμα συνεχίζει να αναπτύσσεται. Ωστόσο, μετά από συγκεκριμένο επώασης, το ποσοστό δημιουργίας χρώματος είναι αρκετά αργό ώστε να επιτρέπεται ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων να προσδιοριστεί μαζί.

Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίζεται με γνώμονα μια κοινή γνωστή πρωτεΐνη (standard protein), όπως είναι η αλβουμίνη βοός (Bovine Serum Albumin; BSA), γνωστής συγκέντρωσης. Παρασκευάζεται μια σειρά αραιώσεων από γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνης και παράλληλα τοποθετείται το δείγμα με την άγνωστη συγκέντρωση, ώστε μέσα από την πρότυπη καμπύλη (Standard curve) να προσδιοριστεί και αυτή.

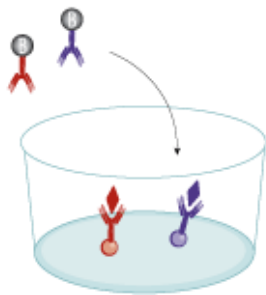
Παραλλαγή της μεθόδου BCA αποτελεί η Micro BCA που εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία (έχει δυνατότητα να ανιχνεύσει μικρότερες συγκεντρώσεις) αλλά έχει μικρότερο δυναμικό εύρος. Συγκεκριμένα, η μέθοδος Micro BCA είναι βελτιστοποιημένη να ανιχνεύει συγκεντρώσεις πρωτεϊνών στο εύρος 0.5-20 µg/mL.

Για το σκοπό της παρούσας εργασίας έγινε χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23225) και του Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23235).

2. 8. Πρωτεομική ανάλυση

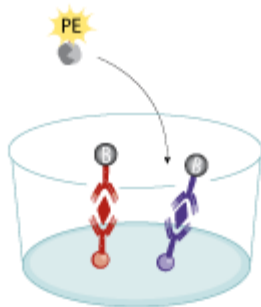
Η μέτρηση φωσφοπρωτεϊνών και κυτοκινών που απελευθερώνουν τα κύτταρα έγινε με χρήση της τεχνολογίας Luminex xMAP. Η Luminex xMAP χρησιμοποιεί ψηφιακή επεξεργασία σήματος ικανή να ταξινομήσει μικροσφαιρίδια πολυεστερενίου σημασμένα με ερυθρά ή κοντά στο υπέρυθρο φλουοροφόρα ή υπερπαραμαγνητικά μικροσφαιρίδια. Αυτές οι αναλογίες ορίζονται ως «φασματική διευθύνσεις» για κάθε πληθυσμό σφαιριδίων. Ως αποτέλεσμα, μέχρι εκατό διαφορετικές αντιδράσεις ανίχνευσης μπορούν να διεξάγονται ταυτόχρονα επί των διαφόρων πληθυσμών σφαιριδίων σε πολύ μικρούς όγκους ενός δείγματος.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μεθόδου της sandwich ELISA (Προσδιορισμός Απορρόφησης Δεσμευμένου Ενζύμου; Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Αυτή



προυποθέτει την ακινητοποίηση του αντισώματος (αντίσωμα επικάλυψης) στη στερεά επιφάνεια και επώαση με το πολυσθενές αντιγόνο. Μετά την απομάκρυνση, με έκπλυση, του αντιγόνου που δεν αντέδρασε, προστίθεται δεύτερο αντίσωμα (αντίσωμα προσδιορισμού ή ανίχνευσης) ως προς το αντιγόνο. Το αντίσωμα ανίχνευσης είναι συνδεδεμένο με ένζυμο που καταλύει αντίδραση παραγωγής σήματος ή

με άλλον ιχνηθέτη. Βάσει αυτών, τα μικροσφαιρίδια επικαλύπτονται με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών προς μέτρηση (αντίσωμα επικάλυψης), που αναμιγνύονται και επωάζονται με το δείγμα. Τα



μικροσφαιρίδια που έχουν συζευχθεί με πρωτεΐνες εντοπίζονται χρησιμοποιώντας βιοτινυλιωμένα αντισώματα ανίχνευσης και σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-φυκοερυθρίνης.

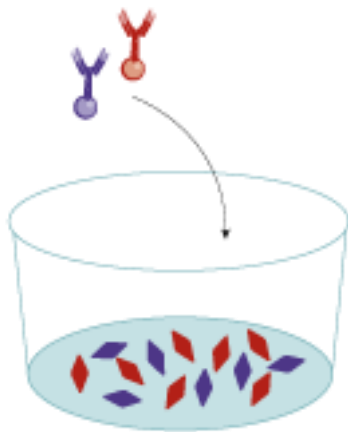
Σχηματικά:

Βήμα 1

Μικροσφαιρίδια με κωδικοποίηση χρώματος και επικαλυμμένα με τα επιθυμητά αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών προς μέτρηση προστίθενται στο δείγμα.

Βήμα 2

Βιοτινυλιωμένα αντισώματα ανίχνευσης έναντι των αναλυτών προστίθενται ώστε να σχηματίσουν sandwich αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος.



Βήμα 3

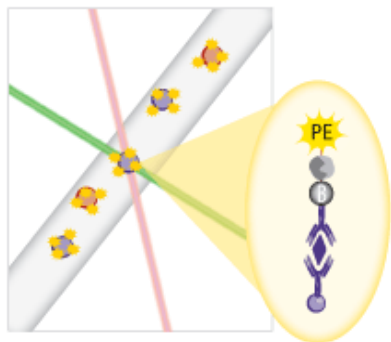
Προσθήκη του συμπλόκου φυκοερυθρίνης (PE)-στρεπταβιδίνης

Βήμα 4

Τα μικροσφαιρίδια ανιχνεύονται από μικροροϊκό σύστημα ανίχνευσης διπλού laser, Luminex 200™. Το ένα laser ταξινομεί το μικροσφαιρίδιο και το δεύτερο προσδιορίζει το επίπεδο σήματος της φυκοερυθρίνης που είναι ευθέως ανάλογο του προσδεμένου αναλύτη.

Εικόνα 2.7 Σχηματική απεικόνιση ELISA (<https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-bead-based-assay-principle>)

Η μέτρηση των φωσφοπρωτεϊνών έγινε στα δείγματα πρωτεΐνης που απομονώθηκαν μετά την λύση των κυτάρων. Μετά από μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης κάθε δείγματος αραιώθηκαν στο διαλύτη τους (lysis buffer) ώστε να έχουν όλα την ίδια συγκέντρωση, με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της ELISA. Χρησιμοποιήθηκαν μικροσφαιρίδια με αντισώματα ανίχνευσης έναντι των εξής πρωτεϊνών: HSPB1, p53, AKT1, JUN, IKBA, AKT1, WNK1, STAT1, STAT5, STAT6, GSK3A, MKO3, FAK1 καθώς επίσης και επίσης για τα PE και BSA για θετικούς μάρτυρες.



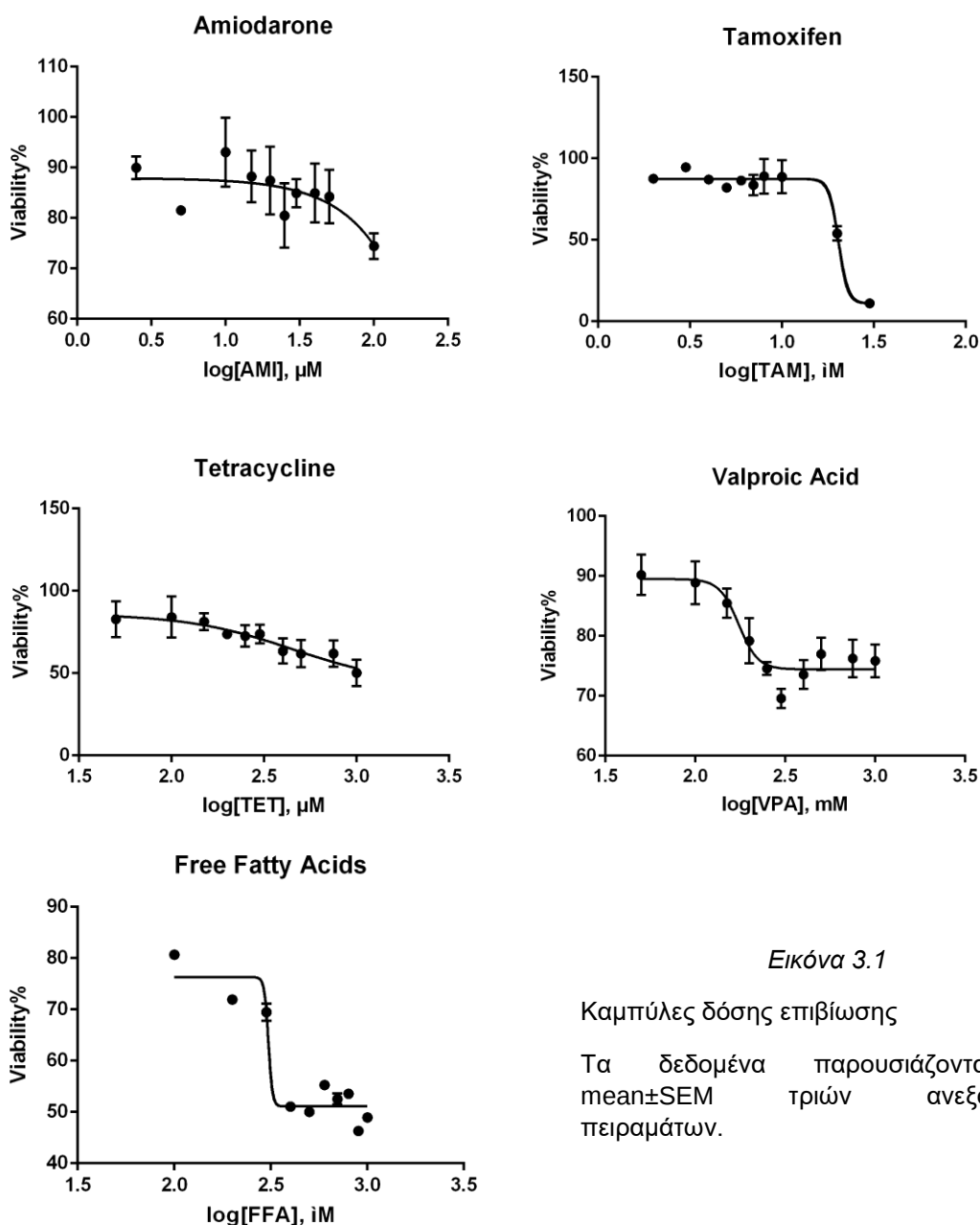
Η μέτρηση των εκκρινόμενων κυτοκινών έγινε σε δείγματα από το υπερκείμενο των κυτάρων μετά από την 24ωρη έκθεση στους επαγωγικούς παράγοντες της νόσου. Επειδή το phenol red που υπάρχει στο θρεπτικό επηρεάζουν τη δράση του BCA, δεν είναι δυνατή η μέτρηση ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε αυτά τα δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν μικροσφαιρίδια με

αντισώματα ανίχνευσης έναντι των εξής πρωτεϊνών: IFNG, IL6, IL8, TNFA, IL1A, TNF10, CXL10, CCL5, IL20 καθώς επίσης και επίσης για τα PE και BSA για θετικούς μάρτυρες.

3. Αποτελέσματα

3.1. Καμπύλες δόσεις-επιβίωσης

Οι καμπύλες δόσης επιβίωσης (Εικόνα 3.1) κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας λογιστικό μοντέλο παλινδρόμησης 4 παραμέτρων, με σκοπό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση που δεν μειώνει τη βιωσιμότητα κάτω από 90% (μη ηπατοτοξική συγκέντρωση) μετά από 24 ώρες επώαση. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$ τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Από αυτό το μοντέλο έγινε υπολογισμός των τιμών EC_{50} και στη συνέχεια των EC_{90} , με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism 6.0.



Εικόνα 3.1

Καμπύλες δόσης επιβίωσης

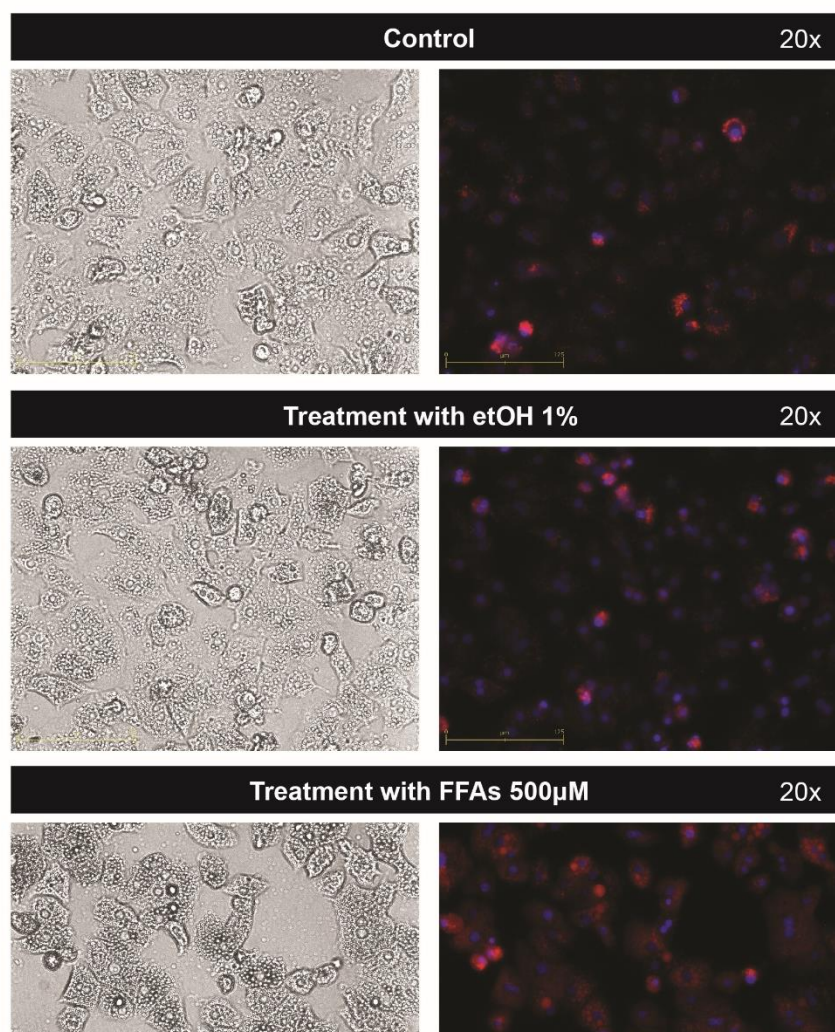
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$ τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Δραστική ουσία	EC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)
Amiodarone	29.77 ± 3.599	6.98 ± 3.600
Tamoxifen	20.28 ± 1.485	17.71 ± 1.488
Tetracycline	452.9 ± 7.312	150.3 ± 7.312
Valproic Acid	17420.2 ± 1.408	13200.8 ± 1.686
Free Fatty Acids	307 ± 2.006	291.07 ± 2.006

Πίνακας 3.1: Τιμές EC₅₀ (±SEM) και EC₉₀ (±SEM)

3.2. High Content Screening των σταγονιδίων λιπιδίων

Το ενδοκυτταρικό φορτίο λιπιδίων προσδιορίστηκε με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής Nile Red. Μικροσκοπικές εικόνες (Εικόνες 3.2, 3.3) έδειξαν παρουσία ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων, όπου το μέγεθος και ο αριθμός φαίνεται να αυξάνεται σε σχέση με τα control.



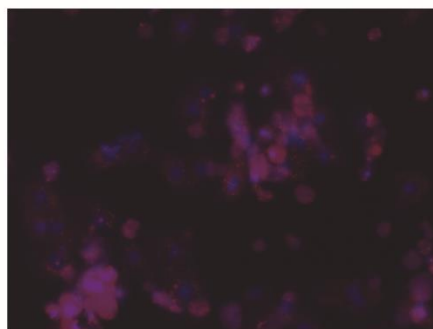
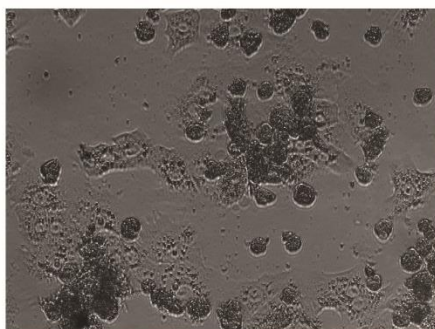
Εικόνα 3.2

Ενδείξεις ενδοκυτταρικής συγκέντρωση λιπιδίων από μικροσκοπία φθορισμού (οπτικός φακός 20x)



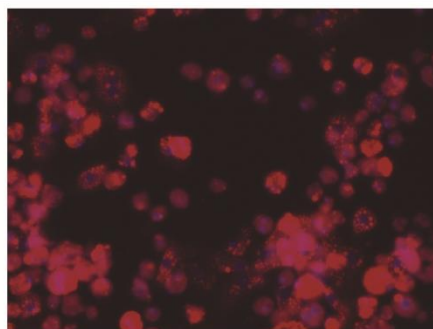
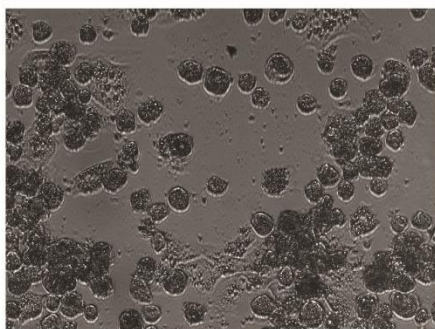
Treatment with DMSO 0,1%

20x



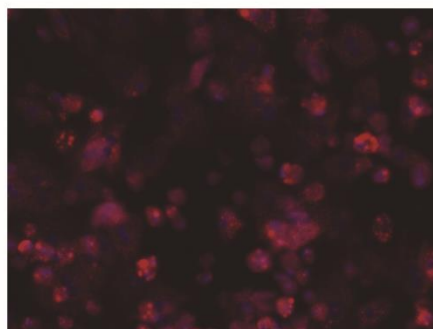
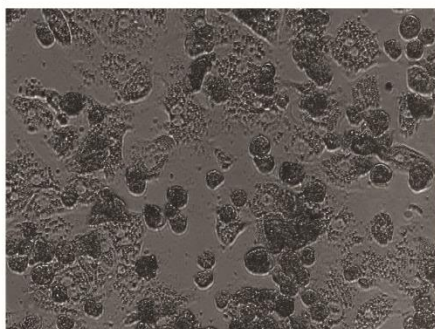
Treatment with Amiodarone 20μM

20x



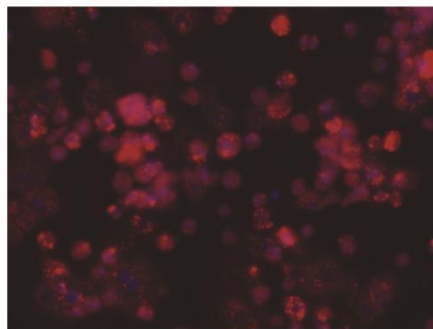
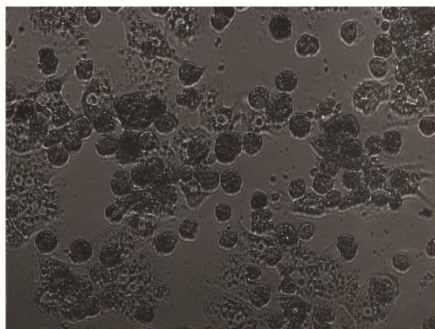
Treatment with Tamoxifen 8μM

20x



Treatment with Tetracycline 150μM

20x

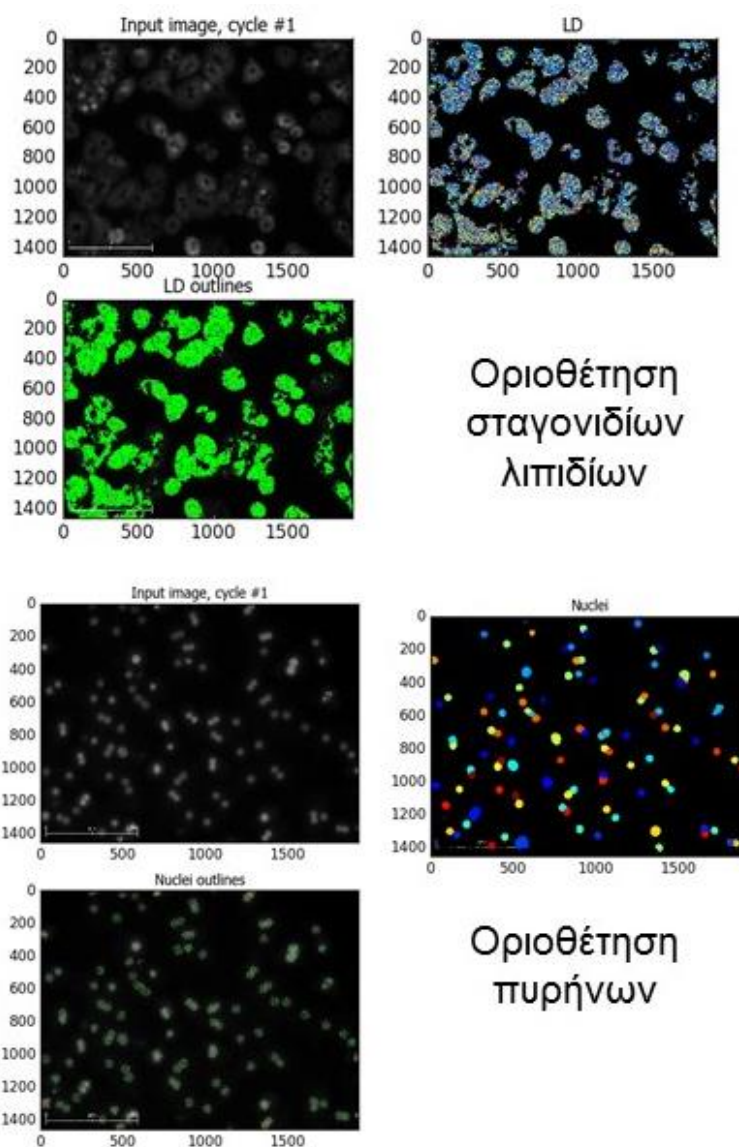


Εικόνα 3.3

Ενδείξεις ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης λιπιδίων από μικροσκοπία φθορισμού (οπτικός φακός 20x)

3.3. Image analysis

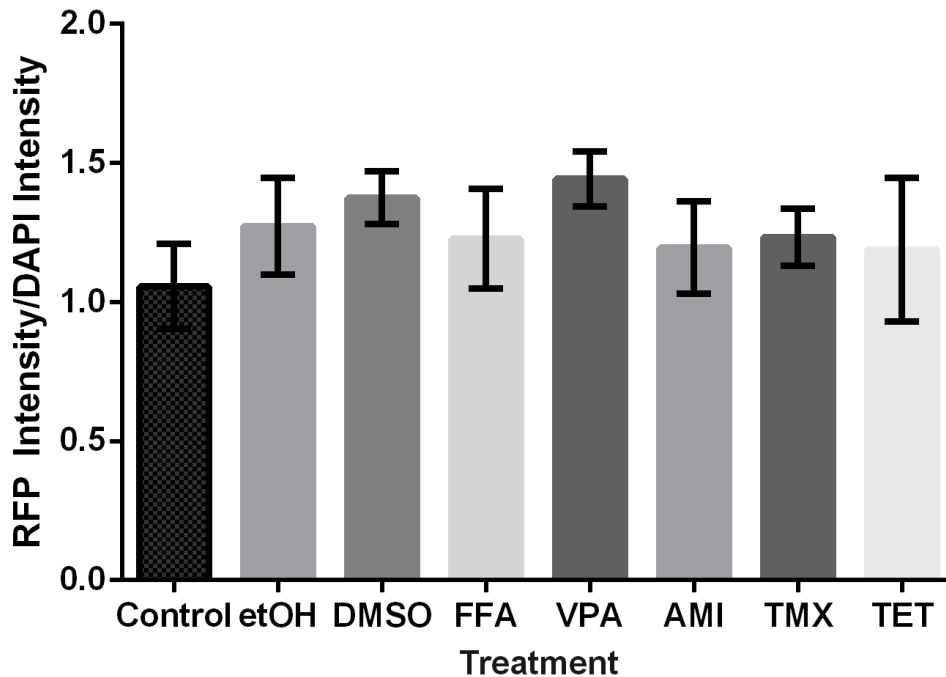
Η ποσοτικοποίηση των ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων έγινε υπολογιστικά, με χρήση του ελεύθερου λογισμικού CellProfiler. Σε αυτό αναγνωρίστηκαν η πυρήνες των κυττάρων και στα ενδοκυτταρικά λιπισταγονίδια (Εικόνα 3.4) και μετρήθηκε η ένταση των χρωμάτων σε αυτά. Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση προσδιορίστηκε ως $RFP\ Intensity / DAPI\ Intensity$ (Εικόνα 3.5)



Εικόνα 3.5

Οριοθέτηση πυρήνων των ηπατοκυττάρων και ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λιπιδίων στο λογισμικό CellProfiler.

Ενδοκυτταρική συγκέντρωση σταγονιδίων λιπιδίων

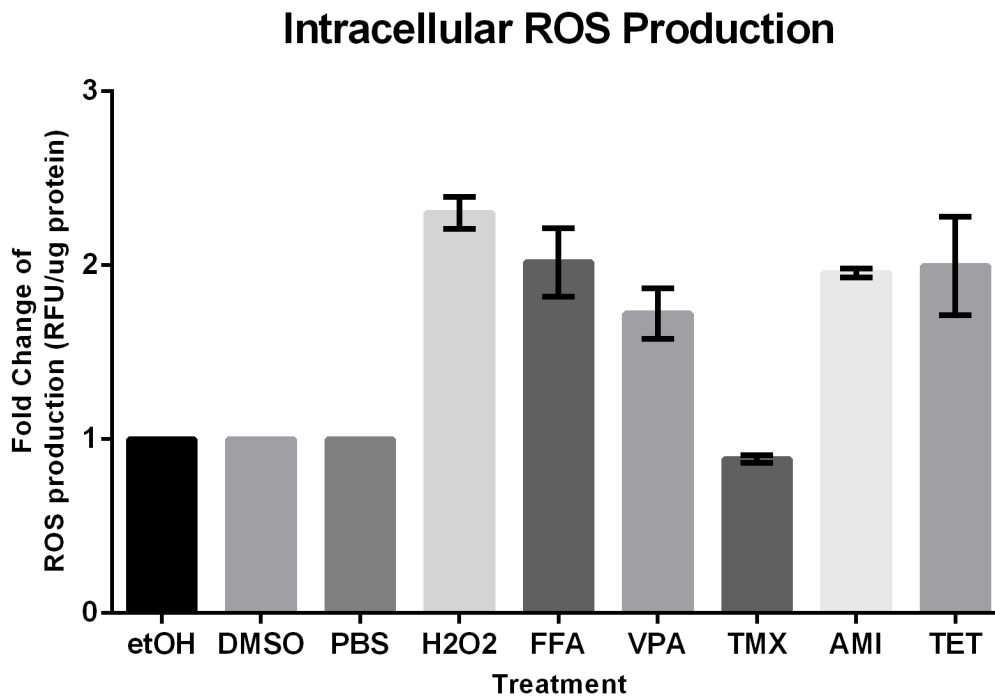


Εικόνα 3.5

Ενδοκυτταρική συγκέντρωση σταγονιδίων λιπιδίων RFP Intensity/DAPI Intensity ως mean $\pm$ SEM 3 ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

3.4. Ποσοτικοποίηση της παραγωγής ενδοκυτταρικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS)

Η ποσοτικοποίηση της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου έγινε με χρήση του φθορίζοντος υποστρώματος CM-H₂DCFDA. Ο φθορισμός μετρήθηκε με φασματοφωτομετρία και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης και παρουσιάζονται ως λόγος μεταβολής των δειγμάτων προς τα control RFU/μg πρωτεΐνης (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5

Ενδοκυτταρικά ROS μετά από 24 ώρες επώαση. Λόγος μεταβολής των επαγωγικών ουσιών σε σχέση με τα control. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SEM 3 ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

Η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε μέσω μη παραμετρικής ANOVA. Όλες οι μεταβολές έδειξαν $P < 0,05$, με εξαίρεση το Tamoxifen.

3.5. Πρωτεομική Ανάλυση – MultiPlex ELISA

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης φωσφοπρωτεϊνών (Πίνακας 3.2) και εκκρινόμενων κυτοκινών (Πίνακας 3.3) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις FFAs, ως λόγος μεταβολής των επαγωγικών συγκεντρώσεων σε σχέση με τα control. Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με Students *t test*. Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζονται γραφικά οι μεταβολές αυτές.

		Phosphoproteins						
FFA Treatment (μM)		AKT1	FAK1	HSBP1	IKBA	JUN	STAT6	WNK1
	100	0.67	0.88	0.66	0.60	0.73	0.75	0.66
	200	0.65	0.83	0.65	0.69	0.76	0.75	0.64
	300	0.72	0.86	0.71	0.80	0.80	0.81	0.66
	400	0.64	0.81	0.67	0.67	0.73	0.67	0.54
	500	0.66	0.81	0.64	0.66	0.73	0.68	0.57
	600	0.67	0.86	0.67	0.62	0.75	0.66	0.59
	700	0.69	0.85	0.70	0.68	0.78	0.73	0.66
	800	0.67	0.85	0.76	0.73	0.85	0.71	0.61
	900	0.67	0.87	0.72	0.70	0.79	0.73	0.60
	1000	0.62	0.91	0.75	0.70	0.74	0.74	0.60
		LEGEND						
		value	CV < 20%					
		value	< 0.75					

Πίνακας 3.2

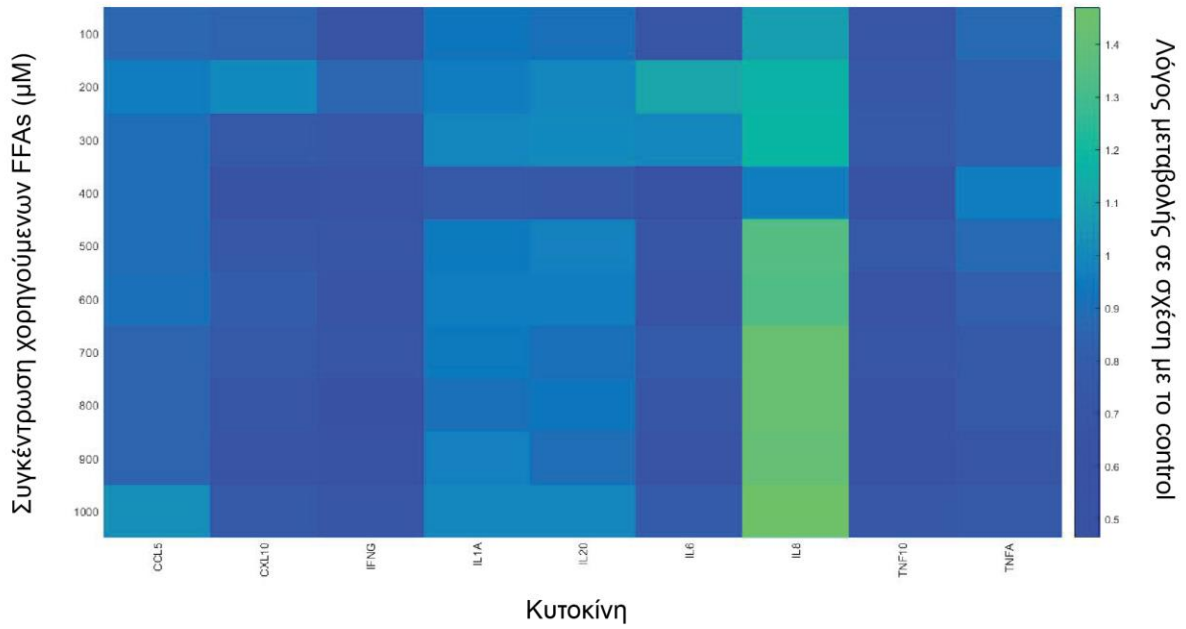
Μέτρηση φωσφοπρωτεϊνών – λόγος μεταβολής των επαγωγικών συγκεντρώσεων σε σχέση με τα control από 3 ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα

		Secreted Proteins								
FFA Treatment (μM)		CCL5	CXL10	IFNG	IL1A	IL20	IL6	IL8	TNF10	TNFA
	100	0.87	0.84	0.70	0.93	0.91	0.71	1.09	0.71	0.88
	200	0.97	1.01	0.87	0.96	0.98	1.11	1.16	0.75	0.83
	300	0.89	0.76	0.75	1.00	1.00	0.99	1.18	0.78	0.83
	400	0.90	0.66	0.67	0.77	0.76	0.46	0.95	0.65	0.96
	500	0.89	0.76	0.72	0.95	0.98	0.73	1.36	0.78	0.87
	600	0.91	0.80	0.69	0.96	0.96	0.70	1.34	0.68	0.82
	700	0.85	0.78	0.71	0.94	0.92	0.79	1.43	0.71	0.77
	800	0.85	0.71	0.61	0.91	0.93	0.72	1.44	0.65	0.77
	900	0.84	0.68	0.65	0.97	0.90	0.68	1.41	0.66	0.71
	1000	1.03	0.77	0.73	0.99	0.99	0.78	1.47	0.75	0.77
									LEGEND	
									value	CV < 20%
									value	< 0.75

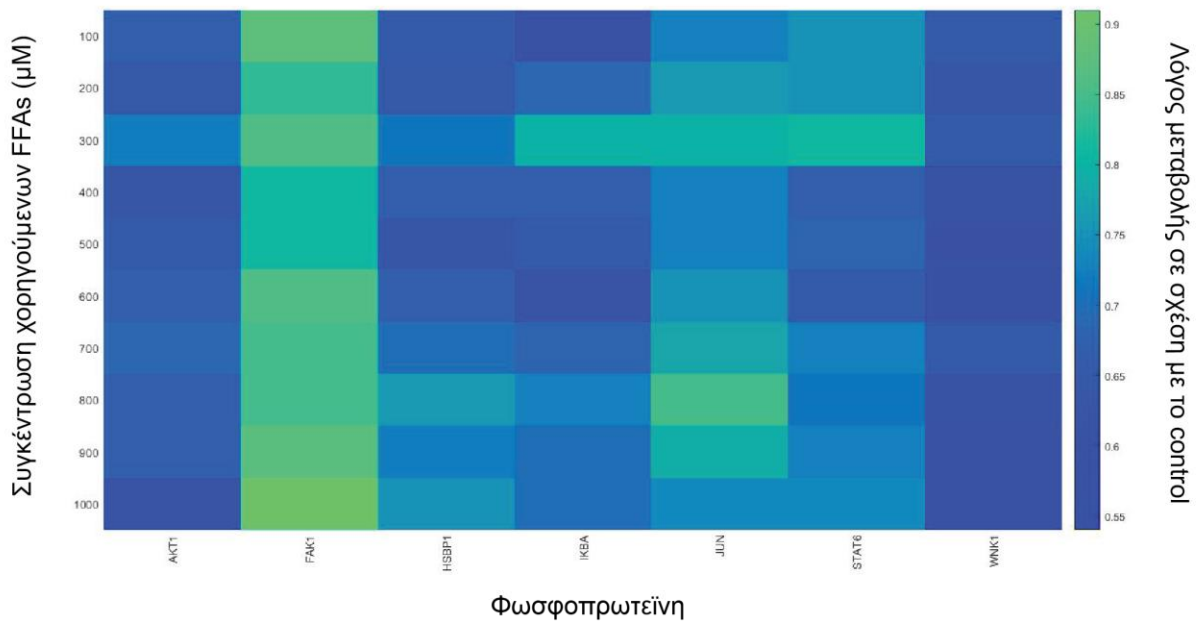
Πίνακας 3.3

Μέτρηση εκκρινόμενων κυτοκινών – λόγος μεταβολής των επαγωγικών συγκεντρώσεων σε σχέση με τα control από 3 ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα

Heatmap εκκρινόμενων κυτοκινών



Heatmap Φωσφοπρωτεϊνών



Εικόνα 3.5

Γραφική αναπαράσταση του λόγου μεταβολής πρωτεϊνικής έκφρασης σε χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων FFAs σε σχέση με τα control

4. Συμπεράσματα

Όπως αναφέρθηκε και εισαγωγικά, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως το ηπατοκύτταρο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην στεάτωση και την ίνωση, και πως αυτά τα γεγονότα σχετίζονται με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες.

Στην παρούσα μελέτη περιγράψαμε *in vitro* μοντέλα της NAFLD σε πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα που μπορούν να μιμηθούν διεργασίες που παρατηρούνται *in vivo*, δηλαδή ενδοκυτταρική συσσώρευση λιπιδίων και οξειδωτικό στρες. Πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα εκτέθηκαν σε μη τοξικές συγκεντρώσεις FFA, Valproic Acid, Amiodarone hydrochloride, Tmaoxifen citrate και Tetracycline hydrochloride. Με αυτό το πειραματικό σχεδιασμό παρατηρήσαμε αύξηση του ενδοκυτταρικού φορτίου λιπιδίων, άρα εδραίωση ηπατικής στεάτωσης, και της παραγωγής ενδοκυτταρικών ROS. Η ανθρώπινη NAFLD σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες, και επακόλουθη περοξειδωση των λιπιδίων μπορεί να καθορίσει τη μετάβαση από απλή στεάτωση σε στεατοηπατίτιδα. Στα *in vitro* μοντέλα που κατασκευάσαμε, παρατηρήθηκε ενδοκυτταρική παραγωγή ROS όμοια με αυτή που προκαλείται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου, που είναι γνωστός οξειδωτικός παράγοντας. Καταφέραμε συνεπώς, να ποσοτικοποιήσουμε τις φαινοτυπικές αλλαγές που προκάλει η νόσος μέσω μέτρησης των δύο αυτών χαρακτηριστικών.

Τέλος έγινε μια πρώτη προσέγγιση ανάλυσης του πρωτεομικού προφίλ του μηχανισμού της NAFLD, με μέτρηση φωσφοπρωτεϊνών και εκκρινόμενων κυτοκινών, μετά από έκθεση των ηπατοκυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις FFA. Διαπιστώσαμε μείωση της AKT (όπως έχει παρατηρηθεί και από προηγούμενες μελέτες) και μη-κανονικά πρότυπα φωσφορυλίωσης των IKBA, JUN, STAT6, WNK1 καθώς και έκκρισης των TNFA, TNF10 και TNFG.

Ωστόσο χρειάζεται περισσότερα βιολογικά δείγματα για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα τόσο από τη φαινοτυπική όσο και από πρωτεομική ανάλυση. Επίσης απαιτείται η μέτρηση περισσότερων πρωτεϊνών για να διασφαισθούν οι μοριακοί μηχανισμοί.

Τα παρόντα αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ενδεικτική προσέγγιση του θέματος. Οι μελέτες συνεχίζονται με πρωτεομική ανάλυση δειγμάτων μετά από απαγωγή της νόσου με φαρμακολογικούς παράγοντες. Ο απώτερος στόχος είναι μέσω της αναγνώρισης των μοριακών μηχανισμών αλλά και των διαφοροποιήσεων στη γονιδιακή έκφραση να προσδιοριστούνε μόρια στόχοι που θα αντιστρέψουν τη πορεία της νόσου.

6. Βιβλιογραφία

1. Angulo P., Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, *N Eng J Med*, 2002, 346:1221-1236
2. J.K. Dowman, J.W. Tomlinson, P.N. Newsome, Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease, *Qjm*, 2010, 71-83
3. B.M. Attar K., Van Thiel D.H., Current concepts and management approaches in non-alcoholic fatty liver disease, *Sci. World J*, 2013, 481893
4. Bambha K. et al., Ethnicity and non-alcoholic fatty liver disease, *Hepatology*, 2012, 55:865-873
5. Eksdtedt et. Al., Long-term follow up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes, *Hepatology*, 2006, 44:865-873
6. Argo CK., Al-Osaimi AM, Cardwell SH, Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease, *J. Hepatology*, 2009, 51:371-379
7. Hamabe A. et al., Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period, *J. Gastroenterology*, 2011, 46:769-778
8. Dunn W., Xu R., Schwimmer J.B., Modest wine drinking and decreased prevalence of suspected nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology*, 2008, 47:7947-1954
9. Than N.N., Newsome P.N., A concise review of non-alcoholic fatty liver disease, *Atherosclerosis*, 2015, 219:192-202
10. C.P. Day, O.F. James, Steatohepatitis: a tale of "two hits"?, *Gastroenterology*, 1998, 114:842-845
11. Jeremy M Berg, John L Tymoczko, and Lubert Stryer, *Biochemistry*, New York: W H Freeman; 2002, ISBN-10: 0-7167-3051-0
12. Neuschwander-Tetri BA, Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites, *Hepatology*, 2010, 52:774-788
13. Alba Berlanga, Esther Guiu-Jurado, José Antonio Porras, Teresa Auguet, Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease, *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2014, 7:221-239
14. Lambert JE, Ramos Roman MA, Browning JD, et al. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with non-alcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, 2014, 14:726-735
15. Stefan N., Kantartzis K., Haring HU, Causes and metabolic consequences of fatty liver, *Endocr Rev*, 2008, 29:939-960
16. Buzzeti E, Pinzani M, Tsohatzis E.A., The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Metabolism*, 2016, 65:1038-1048
17. Sabio G, Das M, Mora A, et al., A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance, *Science*, 2008, 322:1539-1543
18. Begriche K, Igoujil A, Pessayre E, et al., Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible outcomes, *Mitochondrion*, 2006, 6:1-28
19. Paradies G, Paradies V, Ruggieto FM et al., Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease, *World J Gastroenterology*, 2014, 14:581-597
20. Kapoor A, Sanyal AJ, Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response, *Clin Liver Disease*, 2009, 13:581-590
21. Park SW, Zhou Y, Lee J, et al., The regulatory subunits of P13K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increases its nuclear translocation, *Nature Medicine*, 2010, 16:429-437
22. Tilg H, Moschen AR, Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis, *Hepatology*, 2010, 52:1836-1846
23. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S et al., Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors and activation of NF-kappaB in the liver of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis patients, *American Journal of Gastroenterology*, 2004, 99:1708-1717
24. J.K. Dowman, J.W. Tomlinson, P.N. Newsome, Systematic Review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis, *Alimentary Pharmacology Ther.*, 2011, 33:525-540
25. Veronica Martin-Dominguez, R.G-C.J. Mendoza-Jimenes-Ridruejo, Luisa Garcia-Buey, Ricardo Moreno-Otero, Pathogenesis, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease, *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2013, 105:409-420
26. J.K. Dowman et al., Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease, *Diabetes Obesity Metabolism*, 2013, 13:692-702
27. J.K. Dowman et al., Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease, *Diabetes Obesity Metabolism*, 2013, 13:692-702

28. N.C. Chavez-Tapia, N. Rosso and C. Tiribelli, *In Vitro Models for the Study of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18, 1079-1084
29. Tirosh, O.; Ilan, E.; Anavi, S.; Ramadori, G.; Madar, Z. Nutritional lipid- induced oxidative stress leads to mitochondrial dysfunction followed by necrotic death in FaO hepatocytes. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*, 2009, 25(2), 200-208.
30. Janorkar, A.V.; King, K.R.; Megeed, Z.; Yarmush, M.L. Development of an *in vitro* cell culture model of hepatic steatosis using hepatocyte-derived reporter cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(5), 1466-1474.
31. Gentile, C.L.; Pagliassotti, M.J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nut r. Biochem.*, 2008, 19(9), 567-576
32. Liane Rabinowich and Oren Shibolet, *Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease*, 2015, BioMed Research International, Volume 2015
33. Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem* 2013; 46: 1323-1338 [PMID: 23792104 DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.012]
34. Powell-Jackson PR, Tredger JM, Williams R. Hepatotoxicity to sodium valproate: a review. *Gut* 1984; 25: 673-681
35. Verrotti A, D'Egidio C, Mohn A, Coppola G, Chiarelli F. Weight gain following treatment with valproic acid: pathogenetic mechanisms and clinical implications. *Obes Rev* 2011; 12: e32-e43
36. Pylvänen V, Knip M, Pakarinen A, Kotila M, Turkka J, Isojärvi JI. Serum insulin and leptin levels in valproate-associated obesity. *Epilepsia* 2002; 43: 514-517
37. Luef GJ, Lechleitner M, Bauer G, Trinkla E, Hengster P. Valproic acid modulates islet cell insulin secretion: a possible mechanism of weight gain in epilepsy patients. *Epilepsy Res* 2003; 55: 53-58
38. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52: 1-8
39. Meeker RB, Myers RD. GABA and glutamate: possible metabolic intermediaries involved in the hypothalamic regulation of food intake. *Brain Res* 1980; 5: 253-259
40. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:7-18
41. Wong HY, Chu TS, Lai JC, Fung KP, Fok TF, Fujii T, Ho YY. Sodium valproate inhibits glucose transport and exacerbates Glut1 deficiency in vitro. *J Cell Biochem* 2005; 96: 775-785
42. Edoardo Farinelli, David Giampaoli, Anja Cenciarini, Ephraim Cercado, Alberto Verrotti, Valproic acid and nonalcoholic fatty liver disease: A possible association?, *World J Hepatol* 2015 May 28; 7(9): 1251-1257
43. Turnbull DM, Bone AJ, Bartlett K, Koundakjian PP, Sherratt HS. The effects of valproate on intermediary metabolism in isolated rat hepatocytes and intact rats. *Biochem. Pharmacol.* 1983;32:1887-92
44. Ponchaut S, van Hoof F, Veitch K. In vitro effects of valproate and valproate metabolites on mitochondrial oxidations. Relevance of CoA sequestration to the observed inhibitions. *Biochem. Pharmacol.* 1992;43:2435-42
45. Kassahun K, Farrell K, Abbott F. Identification and characterization of the glutathione and N-acetylcysteine conjugates of (E)-2-propyl-2,4-pentadienoic acid, a toxic metabolite of valproic acid, in rats and humans. *Drug Metab. Dispos.* 1991;19:525-35
46. Sadeque AJ, Fisher MB, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Rettie AE. Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;283:698-703
47. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1998;1366:177-96
48. Aires CC, Ijlst L, Stet F, Prip-Buus C, de Almeida IT, Duran M, et al. Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT 1A) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. *Biochem. Pharmacol.* 2010;79:792-9
49. J. Willebrords et al., Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research, *Progress in Lipid Research* 59 (2015) 106-125
50. Varbiro G, Toth A, Tapodi A, Veres B, Sumegi B, Gallyas F. Concentration dependent mitochondrial effect of amiodarone. *Biochem. Pharmacol.* 2003;65:1115-28
51. Liane Rabinowich and Oren Shibolet, *Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease*, 2015, BioMed Research International, Volume 2015

52. S. Antherieu, A. Rogue, B. Fromenty, A. Guillouzo, and M.A. Robin, "Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in heparg cells," *Hepatology*, 53;1895-1905,2011
53. A. Berson, V. de Beco, P. Letteron et al., "Steatohepatitis inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes," *Gastroenterology*, vol.114, no. 4 I, pp. 764-774, 1998
54. Felser A, Blum K, Lindinger PW, Bouitbir J, Krähenbühl S. Mechanisms of hepatocellular toxicity associated with dronedarone—a comparison to amiodarone. *Toxicol. Sci.* 2013;131:480-90
55. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001;65:232-60
56. Lepper, M. H., Wolfe, C. K., Zimmerman, H. J., Caldwell, E. R., Spies, H. W., and Dowling, H. F. (1951). Effects of high doses of Aureomycin on human liver. *Arch. Intern. Med.* 88, 271-283
57. Deboyser, D.; Goethals, F.; Krack, G.; Roberfroid, M. Investigation into the mechanism of tetracycline-induced steatosis: study in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1989, 97(3), 473-479
58. Fromenty, B., Fisch, C, Labbe, G., Degott, C, Deschamps, D., Berson, A., Letteron, P., and Pessayre, D. (1990). Amiodarone inhibits mitochondrial beta-oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis in the liver of mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 1371-1376
59. You-Jin Choi, Chae-Hyeon Lee, Kang-Yo Lee, Seung-Hwan Jung, and Byung-Hoon Lee, Increased Hepatic Fatty Acid Uptake and Esterification Contribute to Tetracycline-Induced Steatosis in Mice, *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 145(2), 2015, 273-282
60. Tuquet C, Dupont J, Mesneau A, Roussaux J. Effects of tamoxifen on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biol. Toxicol.* 2000;16:207-19
61. F.Zhao,P.Xie,J.Jiang,L.Zhang,W.An,andY.Zhan, "The effect and mechanism of tamoxifen-induced hepatocyte steatosis in vitro," *International Journal of Molecular Sciences*,vol.15,no.3, pp.4019-4030,2014
62. I. Larosche, P. Letteron, B. Fromenty et al., "Tamoxifen inhibits topoisomerases, depletes mitochondrial DNA, and triggers steatosis in mouse liver," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*,vol.321,no.2,pp.526-535,2007
63. L. K. Cole, R. L. Jacobs, and D. E. Vance, "Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis," *Hepatology*, vol. 52, no. 4, pp. 1258-1265, 2010
64. G. M. Suddek, "Protective role of thymoquinone against liver damage induced by tamoxifen in female rats," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*,vol.92,no.8,pp.640-644, 2014
65. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J. Clin. Pathol.* 2009;62:481-92
66. Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, Wu TT, Zorzi D, Hoff PM, et al. Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:2065-72
67. Lettéron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003;38:133-40
68. Igoudjil A, Massart J, Begriche K, Descatoire V, Robin MA, Fromenty B. High concentrations of stavudine impair fatty acid oxidation without depleting mitochondrial DNA in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 2008;22:887-98
69. Kennedy JA, Unger SA, Horowitz JD. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 in rat heart and liver by perhexiline and amiodarone. *Biochem. Pharmacol.* 1996;52:273-80
70. Jazcilevich S, Villa-Treviño S. Induction of fatty liver in the rat after cycloheximide administration. *Lab. Invest.* 1970;23:590-4
71. Simon Bucher, Sophie Martinais, Pegah Jalili, Daniel Zalko, Dounia Le Guillou, Anne Corlu, Karima Begriche, Marie-Anne Robin, Karine Rondel, Bernard Fromenty, Bisphenol A Induces Steatosis in HepaRG Cells Using a Model of Perinatal Exposure, 2016 Wiley Periodicals
72. De Gottardi A, Vinciguerra M, Sgroi A, Moukil M, Ravier-Dall'Antonia F, Paziienza V, et al. Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. *Lab. Invest.* 2007;87:792-806
73. Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am. J. Transl. Res.* 2010;2:95-104
74. Chavez-Tapia NC, Rosso N, Tiribelli C. Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:20

75. Robim M, Rodrigues, Steven Branson, Veerle De Boe, Agapios Sachinidis, Vera Rogiers, Joery De Kock, Tamara Vanhaecke, In vitro assessment of drug-induced liver steatosis based on human dermal stem cell-derived hepatic cells, *Arch Toxicol* (2016) 90:677–689
76. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J.* 1999;13:1883–900
77. Krause P, Saghatolislam F, Koenig S, Unthan-Fechner K, Probst I. Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2009;45:205–12
78. Khetani SR, Bhatia SN. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* 2008;26:120–6
79. Giraudi PJ, Barbero Becerra VJ, Marin V, Chavez-Tapia NC, Tiribelli C, Rosso N. The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. *Exp. Mol. Pathol.* 2014;98:85–92
80. Bhatia SN, Yarmush ML, Toner M. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997;34:189–99
81. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicol.* 2013;87:1315–530
82. Nativ NI, Yarmush G, Chen A, Dong D, Henry SD, Guarrera JV, et al. Rat hepatocyte culture model of macrosteatosis: effect of macrosteatosis induction and reversal on viability and liver-specific function. *J. Hepatol.* 2013;59:1307–14
83. Parmentier C, Truissi GL, Moenks K, Stanzel S, Lukas A, Kopp-Schneider A, et al. Transcriptomic hepatotoxicity signature of chlorpromazine after short- and long-term exposure in primary human sandwich cultures. *Drug Metab. Dispos.* 2013;41:1835–42
84. Surendraddoss J, Chang TK, Abbott FS. Evaluation of in situ generated valproyl 1-O-b-acyl glucuronide in valproic acid toxicity in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 2014
85. Janorkar AV, Harris LM, Murphey BS, Sowell BL. Use of three-dimensional spheroids of hepatocyte-derived reporter cells to study the effects of intracellular fat accumulation and subsequent cytokine exposure. *Biotechnol. Bioeng.* 2011;108:1171–80
86. Damelin LH, Coward S, Kirwan M, Collins P, Selden C, Hodgson HJ. Fat-loaded HepG2 spheroids exhibit enhanced protection from Pro-oxidant and cytokine induced damage. *J. Cell. Biochem.* 2007;101:723–34
87. Lu Y, Zhang G, Shen C, Uygun K, Yarmush ML, Meng Q. A novel 3D liver organoid system for elucidation of hepatic glucose metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 2012;109:595–604
88. Szalowska E, van der Burg B, Man HY, Hendriksen PJ, Peijnenburg AA. Model steatogenic compounds (amiodarone, valproic acid, and tetracycline) alter lipid metabolism by different mechanisms in mouse liver slices. *PLoS One* 2014;9:e86795
89. Nassir F, Adewole OL, Brunt EM, Abumrad NA. CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice. *J. Lipid Res.* 2013;54:2988–97
90. Joka D, Wahl K, Moeller S, et al. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2012;55:455-64.
91. Page S, Bircerdinc A, Estep M, et al. Knowledge-based identification of soluble biomarkers: hepatic fibrosis in NAFLD as an example. *PLoS One* 2013;8:e56009.
92. Guy CD, Suzuki A, Burchette JL, et al. Costaining for keratins 8/18 plus ubiquitin improves detection of hepatocyte injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2012;43:790-800.
93. Skoien R, Richardson MM, Jonsson JR, et al. Heterogeneity of fibrosis patterns in non-alcoholic fatty liver disease supports the presence of multiple fibrogenic pathways. *Liver Int* 2013;33:624-32.
94. Canbakan B, Senturk H, Canbakan M, et al. Is alanine aminotransferase level a surrogate biomarker of hepatic apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease? *Biomark Med* 2010;4:205-14.
95. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2011;60:313-26.
96. Carazo A, León J, Casado J, et al. Hepatic expression of adiponectin receptors increases with non-alcoholic fatty liver disease progression in morbid obesity in correlation with glutathione peroxidase 1. *Obes Surg* 2011;21:492-500.
97. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;387:903-8

98. Zelber-Sagi S, Ratzu V, Zvibel I, et al. The association between adipocytokines and biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease-induced liver injury: A study in the general population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012;24:262-9
99. Soriano-Guillen L, Barrios V, Lechuga-Sancho A, Chowen JA, Argente J. Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res* 2004;55:830-5.
100. Boyraz M, Cekmez F, Karaoglu A, Cinaz P, Durak M, Bideci A. Serum adiponectin, leptin, resistin and RBP4 levels in obese and metabolic syndrome children with nonalcoholic fatty liver disease. *Biomark Med* 2013;7:737-45.
101. MG Neuman, LB Cohen, RM Nanau. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2014;28(11):607-618.
102. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1372-1379
103. Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H: Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006, 26:39–45
104. Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, Espejo I, Montero JL, Costan G, Marchal T, Membrives A, Gallardo-Valverde JM, Munoz-Castaneda JR, Arevalo De la Mata M, Muntane J: IL-6 and IGF-1 are independent prognostic factors of liver steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2007, 17:493–503.
105. Alaaeddine N, Sidaoui J, Hilal G, Serhal R, Abedelrahman A, Khoury S: TNFalpha messenger ribonucleic acid (mRNA) in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Eur Cytokine Netw* 2012, 23:107–111
106. Satapathy SK, Sakhuja P, Malhotra V, Sharmma BC, Sarin SK: Beneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrosis and necroinflammation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, 22:634–638.
107. Park SH, Kim BI, Yun JW, Kim JW, Park DI, Cho YK, Sung IK, Park CY, Sohn CI, Jeon WK, Kim H, Rhee EJ, Lee WY, Kim SW: Insulin resistance and creactive protein as independent risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in non-obese Asian men. *J Gastroenterol Hepatol* 2004, 19:694–698
108. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A: High-sensitivity c-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007, 42:573–582.
109. Yoneda M, Uchiyama T, Kato S, Endo H, Fujita K, Yoneda K, Mawatari H, Ijda H, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Maeyama S, Saraga M, Aburatani H, Kodama T, Nakajima A: Plasma pentraxin3 is a novel marker for nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol* 2008, 8:53.
110. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, Taioli E, Valenti L, Fiorelli G: Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001, 96:2448–2455.
111. Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, Yeh MM, Neuschwander-Tetri BA, Chalasani N, Sanyal AJ, Nelson JE: Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012, 55:77–85
112. Sakugawa H, Nakayoshi T, Kobashigawa K, Yamashiro T, Maeshiro T, Miyagi S, Shiroma J, Toyama A, Nakayoshi T, Kinjo F, Saito A: Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2005, 11:255–259
113. Lydatakis H, Hager IP, Kostadelou E, Mpousmpoulas S, Pappas S, Diamantis I: Non-invasive markers to predict the liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006, 26:864–871
114. Tanwar S, Trembling PM, Guha IN, Parkes J, Kaye P, Burt AD, Ryder SD, Aithal GP, Day CP, Rosenberg WM: Validation of PIIINP for the detection and assessment of non-alcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012
115. Neuman M, Hilzenrat N, Cohen L, Winkler RE, Nanau R. Multiple factors involved in nonalcoholic hepatitis pathogenesis. *Int J Hepatol* 2012;2012:429805
116. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ, CRN N. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:894–903
117. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JB, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat. Commun.* 2014;5:4309

118. Kiziltas S, Ata P, Colak Y, Mesçi B, Senates E, Enc F, et al. TLR4 gene polymorphism in patients with nonalcoholic fatty liver disease in comparison to healthy controls. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2014;12:165–70
119. Musso G, Bo S, Cassader M, De Michieli F, Gambino R. Impact of sterol regulatory element-binding factor-1c polymorphism on incidence of nonalcoholic fatty liver disease and on the severity of liver disease and of glucose and lipid dysmetabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013;98:895–906
120. Zheng W, Wang L, Su X, Hu XF. MTP-493G>T polymorphism and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *DNA Cell Biol.* 2014;33:361–9
121. Li MR, Zhang SH, Chao K, Liao XH, Yao JY, Chen MH, et al. Apolipoprotein C3 (-455T>C) polymorphism confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in the Southern Han Chinese population. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:14010–7
122. Lee MH, Hong I, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, et al. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of valproic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007;220:45–59
123. Lee MH, Kim JW, Kim JH, Kang KS, Kong G, Lee MO. Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen. *Toxicol. Lett.* 2010;199:416–24
124. Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Lee MO, Kang KS, et al. Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicol. Sci.* 2006;94:206–16
125. Guillén N, Navarro MA, Arnal C, Noone E, Arbonés-Mainar JM, Acín S, et al. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol. Genomics* 2009;37:187–98
126. Hennig EE, Mikula M, Goryca K, Paziewska A, Ledwon J, Nesteruk M, et al. Extracellular matrix and cytochrome P450 gene expression can distinguish steatohepatitis from steatosis in mice. *J. Cell. Mol. Med.* 2014;18:1762–72
127. Xu E, Forest MP, Schwab M, Avramoglu RK, St-Amand E, Caron AZ, et al. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion promotes hepatic lipid accretion, but reduces NAFLD in diet-induced obesity: potential role of PPAR α . *Hepatology* 2014;59:1803–15
128. Chiappini F, Barrier A, Saffroy R, Domart MC, Dagues N, Azoulay D, et al. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. *Lab. Invest.* 2006;86:154–65
129. Starmann J, Fälth M, Spindelböck W, Lanz KL, Lackner C, Zatloukal K, et al. Gene expression profiling unravels cancer-related hepatic molecular signatures in steatohepatitis but not in steatosis. *PLoS One* 2012;7:e46584
130. Barr J, Caballería J, Martínez-Arranz I, et al. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res* 2012;11:2521–32.
131. Yu C, Xu C, Xu L, Yu J, Miao M, Li Y. Serum proteomic analysis revealed diagnostic value of hemoglobin for nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2012;56:241–7.
132. Miller M, Walsh S, Atirh A, Huang JT, Ferguson MA, Dillon JF. The serum proteome of non-alcoholic fatty liver disease – a multimodal approach to discovery of biomarkers of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2014, 29:1839–1847
133. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2011;60:404–13.
134. 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.
135. Terry L Riss, PhD, Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor, Cell Viability Assays, 2004-, Assay Guidance Manual [Internet], Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, τη σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ.Λεωνίδα Αλεξόπουλου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ.Αλεξόπουλο, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ σε ένα εργαστήριο πλήρως εξοπλισμένο, καθώς και για όλα τα μέσα που μου προσφέρθηκαν για την υλοποίηση της διατριβής μου.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον επιστημονικό συνεργάτη του εργαστηρίου κ. Δημήτριο Τζεράνη για τις πολύτιμες συμβουλές , την καθοδήγηση και τον προσωπικό χρόνο που μου διέθεσε, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου. Τέλος να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτωρ του εργαστηρίου Δημήτριο Μεσσίνη για την συμβολή του στον πειραματικό σχεδιασμό και στην εκτέλεση των πειραμάτων.