



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιολόγηση αιματολογικών παραμέτρων και
εξωκυτταρικών κυστιδίων για τη διάγνωση ασθενών με μη
αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) ως μη επεμβατικοί
διαγνωστικοί βιοδείκτες: συσχέτιση με την παράμετρο
εξασθένησης υπερήχων (UAP)**

POST GRADUATE THESIS

**Evaluation of hematological parameters and extracellular vesicles for
the diagnosis of patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) as
non-invasive diagnostic biomarkers: a correlation with Ultrasound
Attenuation Parameter (UAP)**

ΕΛΕΝΗ-ΜΥΡΤΩ-ΜΑΡΙΑ ΤΡΙΦΥΛΛΗ/ELENI-MYRTO-MARIA TRIFYLLI

Ελένη-Μυρτώ Μαρία Τριφύλλη

Eleni-Myrto-Maria Trifylli

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ /ANASTASIOS KRIEBARDIS

Αναστάσιος- Κριεμπάρδης

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions

Department of Biomedical Sciences

Postgraduate program:

Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Evaluation of hematological parameters and extracellular vesicles for the diagnosis of patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) as non-invasive diagnostic biomarkers: a correlation with Ultrasound Attenuation Parameter (UAP)

ELENI-MYRTO-MARIA TRIFYLLI

20051

trif.lena@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEBARDIS

SECOND SUPERVISOR

HARA GEORGATZAKOU

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 10/2/2023

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Αναστάσιος Κριεμπάρδης	
2 ^{ος} Εξεταστής	Χαρά Γεωργατζάκου	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ελένη Μυρτώ Μαρία Τριφύλλη του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 20051 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ελένη-Μυρτώ-Μαρία Τριφύλλη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα κοντινά μου οικογενειακά πρόσωπα Δώρα, Μαρία και Μάνο για την απέραντη υπομονή , κατανόηση και την βαθύτατη υποστήριξη τους για καθετί που πραγματεύομαι.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συνεργάτες για την υποστήριξη τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Κο. Νικόλαο Παπαδόπουλο, Κο. Αναστάσιο Κριεμπάρδη και στην Κα. Ντόιτς Μέλανι για την ουσιώδη συνεισφορά τους σε αυτήν την εργασία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Διευθυντή μου Κο. Αλοίζο Γεώργιο για την υποστήριξη του και στους φίλους και συνεργάτες Ε. Κούστα και Γ.Ζήση για την γνώση και την καθοδήγηση που μου πρόσφεραν.

Αφιερώσεις

Εις μνήμην του αγαπημένου μου πατέρα Ιωάννη Τριφύλλη, Αναισθησιολόγου που με έκανε να αγαπήσω την ιατρική, μου έμαθε να αγαπώ τους ασθενείς μου και να μάχομαι για την επίτευξη των στόχων μου παρά όλες τις αντιξοότητες.

Περίληψη

Εισαγωγή: Υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση των χρόνιων ηπατικών παθήσεων τις τελευταίες δεκαετίες, όπως της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος (NAFLD), με το 30% των ασθενών να παρουσιάζει περαιτέρω ηπατοκυτταρική φλεγμονή, τη λεγόμενη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH), με έλλειψη ή όχι ινωτικής βλάβης. Αιματολογικοί παράγοντες όπως η φερριτίνη παρότι θεωρείται μία παράμετρος οξείας φάσης, παρουσιάζει αύξηση σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο, ωστόσο, δεν είναι ευρέως αποδεκτή η συσχέτιση αυτής της παραμέτρου με την σοβαρότητα της NASH. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα κυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα, από τα οποία παράγονται εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular vesicles EVs), κάποιοι ετερογενείς υποπληθυσμοί νανοδομών σε περιπτώσεις στρες όπως η λιποτοξικότητα, οδηγώντας σε ηπατοκυτταρική βλάβη και σε ανάπτυξη ηπατοπαθειών όπως η NASH. Αλλαγές στην ποσότητα των EVs και των μορίων που μεταφέρουν οδηγεί σε φλεγμονώδη αντίδραση και σταδιακά σε ηπατοκυτταρική βλάβη. Σε αυτή την μελέτη θα αξιολογήσουμε την φερριτίνη ως δείκτη σοβαρότητας της NASH και θα αξιολογήσουμε την παρουσία και τον συνολικό αριθμό των EVs ως εν δυνάμει μη επεμβατικούς βιοδείκτες για την σοβαρότητα της νόσου.

Σκοπός: Στην έρευνα μας θα αξιολογήσουμε αιματολογικές παραμέτρους, ιδίως τα επίπεδα φερριτίνης και την ύπαρξη εξωκυτταρικών κυστιδίων για τη διάγνωση ασθενών με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) ως μη επεμβατικούς διαγνωστικούς βιοδείκτες (αριθμός και μέγεθος αυτών) και θα συσχετίσουμε τα δεδομένα αυτά με την παράμετρο εξασθένησης υπερήχων (UAP) ως προς την σοβαρότητα της νόσου.

Μέθοδος: Επιλέχθηκαν 32 ασθενείς που δεν πάσχουν από διαβήτη και σοβαρά συνοδά νοσήματα (πχ. ηπατίτιδες, καρκίνο κ.α.), οι οποίοι έδωσαν συγκατάθεση για την συλλογή αιματολογικών και βιοχημικών δειγμάτων αίματος, στα οποία αξιολογήθηκαν οι παράγοντες πήξης, η φερριτίνη, καθώς και η παρουσία εξωκυτταρικών κυστιδίων μέσω του οργάνου Panalytic NanoSight με δεδομένα την συγκέντρωση, κατανομή και μέγεθος των σωματιδίων.

Αποτελέσματα: Η συνολική διαγνωστική ακρίβεια των επιπέδων φερριτίνης στην καμπύλη ROC-AUC ήταν 0.843 (95% CI: 0.671-0.947, $p < 0.0001$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο $>278 \text{ ng/ml}$ (ευαισθησία 64.7% και ειδικότητα 93.3%), του BMI ήταν 0.808 (95% CI: 0.63-0.925, $p = 0.0005$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο >27.04 (ευαισθησία 88.2% και

ειδικότητα 80%) και του HSI ήταν 0.731 (95% CI: 0.546-0.872, $p=0.0097$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο >40.9 (ευαισθησία 70.6% και ειδικότητα 73.3%). Στη λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης τα επίπεδα φερριτίνης (OR: 1.0124, 95% CI: 1.002-1.023, $p=0.0199$) και το BMI (OR: 1.4166, 95% CI: 1.0153-1.9766, $p=0.0404$) αποτελούσαν προγνωστικούς δείκτες στεάτωσης με βάση το UAP. Επιπροσθέτως, τα μέσα επίπεδα φερριτίνης ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με στεάτωση βαρύτητας S3 σε σχέση με αυτούς με S1 (454.83ng/ml vs. 228ng/ml, $p=0.044$). Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης, η ύπαρξη στεάτωσης (UAP ≥ 244) συσχετίστηκε με την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων κυστιδίων στο πλάσμα των ασθενών, ενώ η βαρύτητα της στεάτωσης ήταν ανάλογη των επιπέδων των κυστιδίων με σημαντικά αυξημένα επίπεδα στις περιπτώσεις με S3 βαθμού στεάτωσης και μικρή διαφορά στα άτομα με S1-S2. Τέλος, η μέτρηση της μέσης πυκνότητας των κυστιδίων στο πλάσμα ανέδειξε ευαισθησία 92,3% και ειδικότητα 69,2% ως μέθοδος συσχέτισης της βαρύτητας της στεάτωσης – μεγέθους UAP.

Συμπεράσματα: Οι μισοί ασθενείς με στεάτωση έχουν αυξημένα επίπεδα φερριτίνης, τα οποία μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση και στη βαρύτητα της στεάτωσης σε ασθενείς με ΜΑΛΝΗ. Η ύπαρξη στεάτωσης (UAP ≥ 244) συσχετίζεται με την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων κυστιδίων στο πλάσμα των ασθενών με την βαρύτητα της στεάτωσης να είναι ανάλογη των επιπέδων των κυστιδίων με σημαντικά αυξημένα επίπεδα στις περιπτώσεις με S3 βαθμού στεάτωσης.

Λέξεις κλειδιά: εξωκυττάρια κυστίδια (EVs ή EK), φερριτίνη, μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, παράμετρος εξασθένησης υπερήχων,

Abstract

Introduction: There is a marked increase in chronic liver disease in the recent decades, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), with 30% of NAFLD patients developing further hepatocellular inflammation, the so-called non-alcoholic steatohepatitis (NASH), with or without fibrosis. Ferritin is considered an acute phase parameter, although it is increased in patients with NAFLD. However, the association between this parameter and the severity of NASH is not widely accepted. There is a wide range of cells in the hepatic parenchyma that produce extracellular vesicles (EVs) under stress such as lipotoxicity, which constitute heterogeneous subpopulations of nanostructures, leading to hepatocellular damage and the development of NASH. Changes in the amount of EVs and the molecules that they carry lead to an inflammatory reaction and gradually to hepatocellular damage. In this study, we will evaluate ferritin as an indicator of the severity of NASH and the presence of the total number of EVs as potential non-invasive biomarkers of the disease severity.

Purpose: In our research, we will evaluate hematological parameters, more particularly, ferritin levels and the presence of extracellular vesicles in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) as non-invasive diagnostic biomarkers (number and size of them) and we will correlate these data with ultrasound attenuation parameter (UAP) with the severity of the disease.

Method: It was selected a total of 32 patients who do not present diabetes and other serious comorbidities (eg hepatitis, cancer, etc.) consented to the collection of hematological and biochemical blood samples, in which we examined the coagulation factors, ferritin, and the presence of extracellular vesicles via the use of Panalytic NanoSight instrument, with produced data about the concentration, the distribution and the size of the particles.

Results: The overall diagnostic accuracy of ferritin levels in the ROC-AUC curve was 0.843 (95% CI: 0.671-0.947, $p < 0.0001$) with an optimal diagnostic cutoff $> 278 \text{ ng/ml}$ (sensitivity 64.7% and specificity 93.3%), of BMI was 0.808 (95% CI: 0.63-0.925, $p = 0.0005$) with an optimal diagnostic threshold > 27.04 (sensitivity 88.2% and specificity 80%) and of HSI was 0.731 (95% CI: 0.546-0.872, $p = 0.0097$) with an optimal diagnostic threshold > 40.9 (sensitivity 70.6% and specificity 73.3%). In logistic regression analysis ferritin levels (OR:

1.0124, 95% CI: 1.002-1.023, p=0.0199) and BMI (OR: 1.4166, 95% CI: 1.0153-1.9766, p=0.0404) were predictive markers of steatosis based on the UAP. Finally, mean ferritin levels were statistically significantly higher in patients with steatosis of S3 severity than those with S1 (454.83ng/ml vs. 228ng/ml, p=0.044). In the second arm of the study, the existence of steatosis (UAP \geq 244) was associated with the existence of increased levels of vesicles in the patients' plasma, while the severity of steatosis was proportional to the levels of vesicles with significantly increased levels in the cases with S3 steatosis grade and a small difference in those with S1-S2. Finally, measurement of mean plasma vesicle density revealed a sensitivity of 92.3% and a specificity of 69.2% as a method of correlating steatosis severity – UAP.

Discussion: Half of the patients, who present steatosis, concomitantly present increased levels of Ferritin, while ferritin levels could be useful for the diagnosis and the estimation of NAFLD severity. The presence of steatosis (UAP \geq 244) is associated with the presence of increased plasma levels of vesicles, with the severity of steatosis being proportional to the increased levels of the vesicles, especially in patients with S3 grade steatosis.

Key words: extracellular vesicles (EVs), ferritin, non-alcoholic steatohepatitis, ultrasound attenuation parameter

Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής.....	iv
Ευχαριστίες.....	vi
Αφιερώσεις.....	vii
Περίληψη.....	viii
Abstract.....	x
Συνομογραφίες.....	xivi
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή.....	2-6
1.1.1 Επιδημιολογία NASH.....	2
1.1.2 Αιτιοπαθογένεια της NASH/NAFLD.....	2-5
1.1.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί της NAFLD/NASH.....	5-6
1.1.4 Σύγχρονοι μη-επεμβατικοί μέθοδοι διάγνωσης – βιοδείκτες ορού.....	6-7
1.1.5 Σύγχρονοι μη-επεμβατικοί μέθοδοι διάγνωσης – απεικονιστικοί μεθόδοι.....	7-8
1.2.1 Ο ρόλος των εξωκυτταρικών κυστιδίων.....	9-10
1.2.2 Η προέλευση των Evs.....	10-11
1.2.3 Μορφολογικός σχηματισμός Evs.....	11-12
1.2.4 Εξωκυτταρικά κυστίδια και NASH.....	12
1.2.5 Εξωκυττάρια κυστίδια ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες για την NASH.....	13
1.2.6 Μέθοδοι απομόνωσης EV.....	13
1.2.7 Υπερφερριτιναιμία και NASH.....	14
Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι.....	15-17
2.1.1 Σκοπός του ερευνητικού έργου.....	15
2.1.2 Πληθυσμός και συλλογή δειγμάτων.....	16
2.1.3 Ελαστογραφία ήπατος και μέτρηση παράγοντα UAP.....	16
2.1.4 Ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων -EVs (NTA).....	17
2.1.5 Στατιστική επεξεργασία.....	18
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα.....	19

Κεφάλαιο 4. Συζήτηση.....	26
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα.....	28
Κεφάλαιο 6. Αναφορές	29
Πηγές Εικόνων	34

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
CAP	Controlled Attenuation Parameter	
EVs	Extracellular vesicles	Εξωκυτταρικά κυστίδια
FHBL	Familial hypobetalipoproteinemia	οικογενής υποβηταλιποπρωτεϊναιμία
HCC/HKK	hepatocellular carcinoma	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
LSM	liver stiffness measurement	
MRI PDFF	Magnetic Resonance - estimated proton density fat fraction	
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis	Μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease	Μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος
UAP	Ultrasound Attenuation parameter	Παράμετρος εξασθένησης υπερήχων

Πρόλογος

Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) θεωρείται η παρουσία στεάτωσης σε περιπτώσεις απουσίας κατάχρησης αλκοόλ. Η παραπάνω νόσος καθίσταται ως μία από τις πιο σύνηθες αιτίες χρόνιας ηπατοπάθειας διεθνώς. Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται σημαντική άνοδος του επιπολασμού και θεωρείται η δεύτερη πιο συχνή αιτία μεταμόσχευσης ήπατος. Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) χαρακτηρίζεται ως μία πολυσταδιακή διαδικασία, στην οποία εμπεριέχονται επιμέρους ασθένειες όπως η στεάτωση που ακολουθείται από την μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) που οδηγεί σταδιακά σε ίνωση και κίρρωση του ήπατος, η οποία προδιαθέτει για την ηπατική καρκινογένεση και την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η εύρεση βιολογικών δεικτών για την πρόωμη ανίχνευση της νόσου είναι μείζονος σημασίας. Έχει παρατηρηθεί σε πληθώρα ασθενών στα πλαίσια προληπτικού εργαστηριακού ελέγχου, αύξηση σε αιματολογικούς παράγοντες όπως η Φερριτίνη ορού. Η υπερφερριτιναίμια σχετίζεται βάση πρόσφατων μελετών με ηπατοκυτταρική βλάβη παρά με αιμοχρωμάτωση, υποδηλώνοντας την αξιολόγηση αυτής της παραμέτρου ιδιαίτερης σημασίας σε ασθενείς με NAFLD/NASH. Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) κατέχουν ιδιαίτερη σημασία για το ήπαρ καθώς αλληλεπιδρούν με πολλούς τύπους κυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα και συμμετέχουν στην ανάπτυξη ηπατοπάθειας συμπεριλαμβανομένου της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (NASH).

Στην έρευνα μας θα αξιολογήσουμε αιματολογικές παραμέτρους και την ύπαρξη εξωκυτταρικών κυστιδίων για τη διάγνωση ασθενών με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) ως μη επεμβατικούς διαγνωστικούς βιοδείκτες και θα συσχετίσουμε τα δεδομένα αυτά με την παράμετρο εξασθένησης υπερήχων (UAP) ως προς την σοβαρότητα της νόσου.

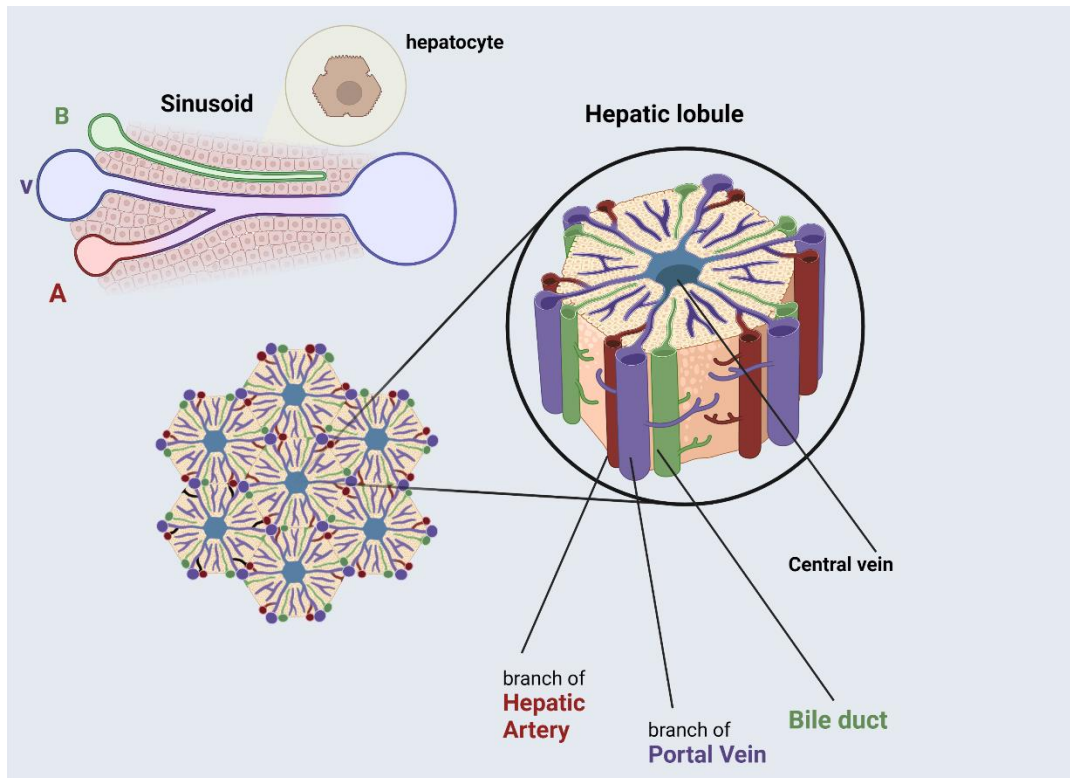
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1.1 Επιδημιολογία NASH

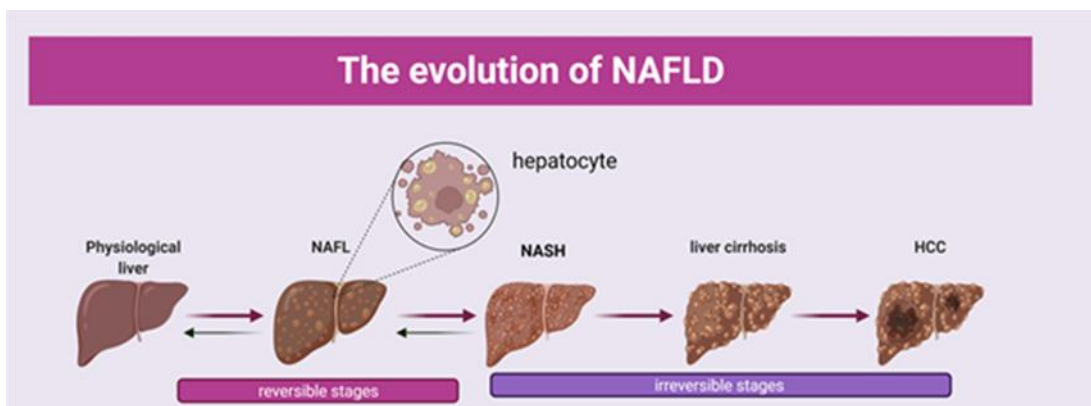
Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) αποτελεί ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα στην σύγχρονη εποχή, που αντικατοπτρίζεται από το γεγονός ότι η NAFLD αποτελεί την κύρια πηγή ηπατοπάθειας στις χώρες τις Δύσης, συμπεριλαμβανομένες τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Κεντρική Ευρώπη. Παράλληλα, αποτελεί τον κύριο λόγο μεταμόσχευσης ήπατος και την πιο συχνή αιτία χρόνιας ηπατικής νόσου στις Ηνωμένες Πολιτείες (Parthasarathy, Revelo, and Malhi 2020). Υπολογίζεται ότι το 25% του συνολικά παγκόσμιου πληθυσμού παρουσιάζει NAFLD, ενώ μόνο το 30% αυτών παρουσιάζει περαιτέρω ηπατοκυτταρική βλάβη με την συνοδή εμφάνιση της NASH, με την παρουσία ή μη ίνωσης. Πιο συγκεκριμένει, η επίπτωση της παραπάνω νόσου ολοένα και αυξάνεται, κυρίως οφειλόμενο στην ανοδική τάση των περιστατικών παχυσαρκίας, μη ινσουλινοεξαρτώμενου Σακχαρώδη Διαβήτη (τύπου II), μεταβολικού συνδρόμου, καθώς και λόγω ποικίλων άλλων παραγόντων που θα αναλυθούν εκτενώς στην συνέχεια (M et al. 2009).

1.1.2 Αιτιοπαθογένεια της NASH/NAFLD

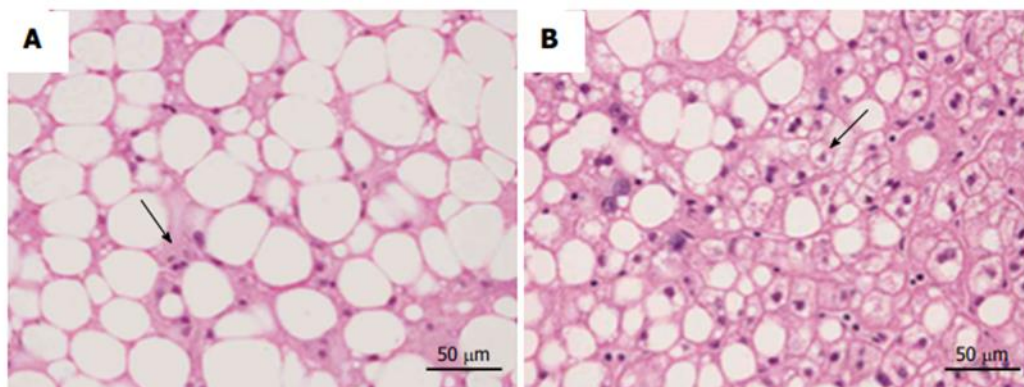
Η NASH/NAFLD καθιστά μια ιδιαίτερα ετερογενή διαταραχή, δημιουργώντας ένα εύρη φάσμα εκφάσεων της νόσου, βάσει πολλαπλών παραμέτρων, όπως το ιστορικό της νόσου και την ιστοπαθολογική εικόνα. Βασικά χαρακτηριστικά που έχουν αναδειχθεί είναι η παρουσία εκσεσημασμένης εναπόθεσης λίπους στο ηπατικό παρέγχυμα χωρίς την παρουσία φλεγμονής (NAFLD), η οποία ξεκινάει συνήθως γύρω από την κεντρική φλέβα (central vein) «βλ. Εικ. 1», είτε με παρουσία ηπατικής βλάβης, φλεγμονής με συνοδό διόγκωση των ηπατοκυττάρων, τα λεγόμενα «ballooned ηπατοκύτταρα» και ύπαρξη ή μη διαφόρων βαθμών ινωτικής βλάβης (NASH). Σταδιακά η ύπαρξη ίνωσης, οδηγεί στην κίρρωση, όπου μπορεί στο έδαφος αυτής να προκαλέσει καρκινογένεση και την εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ΗΚΚ) «βλ. Εικ. 2» (Negro 2020). Η παρουσία χρόνιας φλεγμονής με συνοδό ινωτική βλάβη εντοπίζεται κυρίως στο περίξ των κυττάρων, ενώ κατά την διάρκεια εξέλιξης της νόσου, μπορεί να δημιουργηθεί γεφυροποιός ίνωση με την δημιουργία όζων (αναγεννητικών όζων).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της αρχιτεκτονικής του ηπατικού λοβίου διάταξη του κλάδου της Ηπατικής Αρτηρίας, της Πυλαίας φλέβας, του Χοληδόχου πόρου και κεντρικά της Κεντρικής φλέβας, και το κολποειδές. Πηγή: Η εικόνα σχεδιάστηκε μέσω <https://biorender.com/>



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της προόδου της NAFLD, με την ύπαρξη δύο σταδίων εξέλιξης της νόσου: (i) το αναστρέψιμο από NAFL προς NASH και από NAFL στην προγενέστερη φυσιολογική κατάσταση και το (ii) το μη-αναστρέψιμο από περιπτώσεις NASH με ίνωση, που εξελίσσονται σε κίρρωση και στο έδαφος αυτής εμφανίζεται το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ). Πηγή: Η εικόνα σχεδιάστηκε μέσω <https://biorender.com/>



Εικόνα 4. Οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ NAFLD (A) και NASH (B). Τα βέλη παρουσιάζουν την βασική διαφορά των δύο συνθηκών με το A να παρουσιάζει το ηπατοκύτταρο που δεν παρουσιάζει το λεγόμενο «ballooning» όπως στην περίπτωση του ηπατοκυττάρου στην εικόνα B.

Πηγή: <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i30.3361>.

Υπάρχει η πεποίθηση ότι μόνο τα υπέρβαρα/παχύσαρκα άτομα μπορούν να παρουσιάζουν NAFLD, παρ'όλα αυτά αναφέρεται στην βιβλιογραφία η ύπαρξη της οντότητας «Lean NAFLD», η οποία παρουσιάζεται σε μη παχύσαρκα άτομα (Younossi et al. 2018). Ωστόσο τα άτομα που πάσχουν από αυτή αποτελούν την μειοψηφία (10-20% των Ευρωπαίων ή Αμερικανών). Συνήθως αιτίες για την παραπάνω διαταραχή αποτελούν γενετικοί, ενδοκρινολογικοί, περιβαλλοντικοί και ιατρογενείς παράγοντες, καθώς και συνήθειες στον τρόπο ζωής. Ο γενετικός πολυμορφισμός όπως PNPLA3 (Palatin-like phospholipase domain-Containing protein 3), καθώς και οικογενή μεταβολικά νοσήματα όπως η ανεπάρκεια λυσοσωμικής όξινης λιπάσης και η οικογενής υποβηταλιποπρωτεϊναιμία (FHBL), έχουν συσχετισθεί με την αιτιοπαθογένεια της NAFLD σε αδύνατους ασθενείς. Περιβαλλοντικοί παράγοντες και συνήθειες στον τρόπο ζωής όπως η ασιτία, η αυξημένη κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά ή φρουκτόζη, είτε η αυξημένη κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, έχουν επίσης συσχετισθεί με την εμφάνιση της νόσου σε αυτή την κατηγορία ασθενών, όπως και μεταβολικά και ενδοκρινολογικά νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα μεταβολικές διαταραχές όπως η επίκτητη ή η οικογενής λιποδυστροφία, καθώς και ενδοκρινολογικές διαταραχές, όπως για παράδειγμα η ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, καθώς και ο υποθυρεοειδισμός. Ιατρογενείς αιτίες για την εμφάνιση της «lean-NAFLD» αποτελούν η

παρεντερική διατροφή, η χρήση φαρμακευτικών αγωγών με ταμοξιφαίνη, οιστρογόνα, αμιοδαρόνη, κορτικοστεροειδή, χλωροκίνη, μεθοτρεξάτη, όπως και η αντιρετροϊκή αγωγή.

Επιπλέον, άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ηπατοφακοειδής εκφύλιση ή Νόσος Wilson (αυξημένη εναπόθεση χαλκού στο ηπατικό παρέγχυμα), η Αιμοχρωμάτωση, (αυξημένη απορρόφηση και αποθήκευση σιδήρου σε ποικίλα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος), καθώς και η Κουλιοκάκη ή (Celiac Disease) αυτοάνοση εντεροπάθεια λόγω δυσανεξίας στην γλουτένη) και η Αυτοάνοση ηπατίτιδα έχουν ενοχοποιηθεί για περισσότερο κίνδυνο εμφάνισης NAFLD , όπως επίσης και ο γονότυπος 3 ιογενούς ηπατίτιδας C.

Επιπροσθέτως, ιατρικές επεμβάσεις μπορούν να αποτελέσουν αιτία για την ανάπτυξη της νόσου όπως για παράδειγμα η νησιδοειδική παράκαμψη «bypass».

Η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ πρόσληψης, κατανάλωσης και μεταβολισμού του λίπους αποτελεί την βασική αιτία για την εναπόθεση του λίπους και την δημιουργία την λιποτοξικότητας. Η πρωτοπαθής NASH, αποτελεί έκφανση του μεταβολικού συνδρόμου που εμπεριέχει ποικίλες διαταραχές όπως: η παχυσαρκία ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$), η ιδιοπαθής αρτηριακή υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, καθώς και η αντίσταση στην ινσουλίνη (Budd and Cusi 2020).

Αναπόσπαστο κομμάτι στην αιτιοπαθογένεια της NASH αποτελεί το μικροβίωμα του εντέρου. Όταν υπάρχει εντερική δυσβίωση παρατηρούνται ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στην σύσταση της μικροχλωρίδας του εντέρου, γεγονός που επηρεάζει και τροποποιεί την μεταβολική δραστηριότητα των βακτηριδίων, καθώς και την διαπερατότητα του βλενογόννου, με αποτέλεσμα την αύξηση στην απορρόφηση των λιπαρών οξέων, τα οποία προκύπτουν μετά από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων (Aron-Wisniewsky et al. 2020).

1.1.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί της NAFLD/NASH

Όπως επισημάνθηκε προηγουμένως η διαταραχή στην ενεργειακή ισορροπία μεταξύ πρόσληψης και κατανάλωσης αποτελεί κύριο παράγοντα για την υπεραφθονία σε λιπαρά οξέα, καθώς και υδατάνθρακες. Πέρα από την αυξημένη κατανάλωση μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFA), ένα εναλλακτικό μονοπάτι παραγωγής του αποτελεί η de novo λιπογένεση στο ήπαρ (Pafili and Roden 2021). Συγκεκριμένα στα πλαίσια της παχυσαρκίας, προκαλείται αυξημένος βαθμός λιπώλυσης από τον λιπώδη

ιστό, η οποία προκαλεί περαιτέρω επιδείνωση της ήδη υπάρχουσας αντίστασης στην ινσουλίνη και αύξηση των κυκλοφορούντων λιπιδίων (ελεύθερων λιπαρών οξέων). Η de novo λιπογένεση στο ήπαρ συμβαίνει ανεξάρτητα από την ήδη υπάρχουσα αυξημένη ποσότητα ελεύθερων κυκλοφορούντων λιπιδίων, τα οποία δεσμεύονται από ειδικές πρωτεΐνες, τις λεγόμενες fatty-acid binding proteins (FABPs), οι οποίες ανευρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στον ορό ασθενών με NAFLD. Υπάρχουν ποικίλες υποθέσεις σχετικά με τον μηχανισμό εμφάνισης της νόσου, όπως η θεωρία «Multiple parallel hits theory», η και «Two-hit theory», η θεωρία των πολλαπλών παράλληλων «χτυπημάτων» και η θεωρία των δύο χτυπημάτων, αντιστοίχως. Κατά την πρώτη θεωρία, η οποία θεωρείται η πιο σύγχρονη από της δύο, χωρίς διακριτή ακριβή σειρά των γεγονότων που οδήγησαν στην ηπατοκυτταρική βλάβη, ενώ συμπεριλαμβάνει επίσης το γενετικό υπόβραθρο του ασθενούς. Κατά την θεωρία των 2 «χτυπημάτων» το πρώτο «χτύπημα» οφείλεται στην αντίσταση στην ινσουλίνη και το δεύτερο αποτελεί αποτέλεσμα της τοξικότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Αξίζει να επισημανθεί ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη επιφέρει την αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, με το πρώτο «χτύπημα» να επάγει το δεύτερο. Τέλος, αποτέλεσμα της εναπόθεσης λίπους στο ηπατικό παρέγχυμα, είναι η αλλαγή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, η μείωση της ηπατικής κυκλοφορίας και η παραγωγή κατεχολαμινών. Οι συνθήκες αυτές αποτελούν στρεσογόνους παράγοντες για την λειτουργία του ηπατοκυττάρου, με επακόλουθη την ενεργοποίηση του αποπτοτικού μηχανισμού των ηπατοκυττάρων και την ενεργοποίηση των ηπατικών μακροφάγων (Kupffer) (Ma and Li 2006).

1.1.4 Σύγχρονοι μη-επεμβατικοί μέθοδοι διάγνωσης – βιοδείκτες ορού

Όπως έχει ανεφερθεί προηγουμένως η τακτική αξιολόγηση και παρακολούθηση των ασθενών με NASH καθίσταται εξαιρετικά σημαντική λόγω του γεγονότος ότι η παρουσία ίνωσης αποτελεί έναν προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη της νόσου (Long, Gandhi, and Loomba 2020).

Κάποιοι μη-επεμβατικοί μέθοδοι για την αξιολόγηση αποτελεί το «ηπατικό πάνελ», με τον συνοδό υπολογισμό ποικίλων «σκορ ίνωσης», όπως το NAFLD fibrosis score που εμπεριέχει την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος, τα επίπεδα των τρανσαμινασών (AST, ALT) και της αλβουμίνης, τον αριθμό των αιμοπεταλίων, καθώς και την παρουσία ή μη σακχαρώδους διαβήτη ή της ύπαρξης προδιαβητικών καταστάσεων όπως η διαταραχή

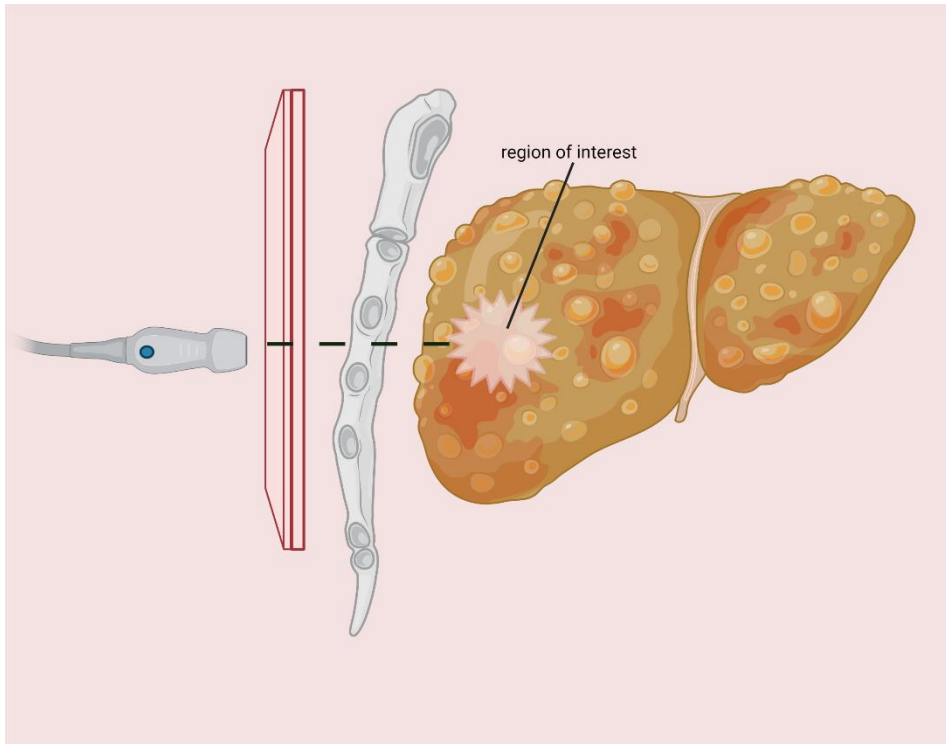
ανοχής στη Γλυκόζη (Treeprasertsuk et al. 2013), όπως επίσης και το Fibrosis-4 (FIB-4) Index, το οποίο εμπεριέχει όμοιους παραμέτρους με το NAFLD fibrosis score, πλην του δείκτη μάζας σώματος, της αλβουμίνης και της παρουσίας ή μη της διαταραχής μεταβολισμού της γλυκόζης (Li, Xu, and Gao 2019). Επιπροσθέτως μπορεί να υπολογιστεί ο δείκτης AST/ALT ratio index, ο οποίος όταν είναι <1 ή ίσο με 1 παραπέμπει την διάγνωση προς την κατεύθυνση της NAFLD/NASH.

Το Fibro Test score, αποτελεί μία άλλη μέθοδο που περιλαμβάνει 6 παραμέτρους όπως το φύλο, την ηλικία και τα επίπεδα της πυροσταφυλικής τρανσαμινάσης (ALT), του χολοστατικού ενζύμου (GGT), της απτοσφαιρίνης, της ολικής χολερυθρίνης, καθώς και της τιμής της α2-μακροσφαιρίνης και της α1- απολιποπρωτεΐνης. Το Hepascore, αποτελεί ένα σύστημα που εμπεριέχει τα επίπεδα του GGT, της τιμής του υαλουρονικού οξέως στον ορό, καθώς και της α2-μακροσφαιρίνης. Το παραπάνω μπορεί να εφαρμοστεί όχι μόνο σε ασθενείς με NAFLD, αλλά και σε περιπτώσεις ιογενούς ηπατίτιδας Β και C (Amernia et al. 2021). Συμπληρωματικά, υπάρχει μία άλλη μέθοδος το FibroMeter NAFLD test, το οποίο με τη σειρά του περιλαμβάνει τις τιμές των τρανσαμινασών, της Φερριτίνης, της ηλικίας, του σωματικού βάρους, καθώς και της τιμής της γλυκόζης ορού και του αριθμού των αιμοπεταλίων (Aykut et al. 2014).

1.1.5 Σύγχρονοι μη-επεμβατικοί μέθοδοι διάγνωσης – απεικονιστικοί μέθοδοι

Εκτός των παραπάνω τεστ που απαιτούν αιμοληψία, υπάρχουν και ποικίλοι απεικονιστικοί μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας για την αξιολόγηση της στεάτωσης με ή χωρίς ίνωση. Κάποιες από τις μεθόδους αποτελούν το ευρέως διαδεδομένο Fibroscan, που εμπεριέχει τις αρχές της Παροδικής Ελαστογραφία (Transient Elastography), (βλ.Εικ.4) κατά την οποία μετριοούνται δύο δείκτες: (i) Controlled Attenuation Parameter (CAP) για την διάγνωση της στεάτωσης μέσω υπολογισμού της ηχητικής απορρόφησης και ελαστικότητας (μονάδα μέτρησης dB/m), και (ii) liver stiffness measurement (LSM) όπου υπολογίζει την «σκληρότητα» του παρεγχύματος, δηλαδή τον βαθμό ίνωσης (φ.τ 2- 6 kPa). Παρόμοια είναι η τεχνική που ακολουθείται στο FibroTouch κατά την οποία γίνεται μέτρηση του (i) Ultrasound Attenuation parameter (UAP), παράγοντα εξασθένησης υπερήχων και (ii) του LSM (Serra et al. 2020). Επιπλέον, μία ακόμη υπερηχογραφική μέθοδος είναι η Ελαστογραφία διατμητικών κυμάτων shear wave ήπατος (shear-wave elastography), που ποσοτικοποιεί την «σκληρότητα» του

παρεγχύματος, μέσω της μέτρησης της ταχύτητας των κυμάτων στο ήπαρ (Morin et al. 2021), ενώ παράλληλα υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ως μέθοδο ποσοτικής αξιολόγησης της στεάτωσης την μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance - estimated proton density fat fraction (MRI-PDFF) (Caussy et al. 2018).







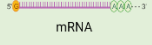
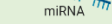





Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση Παροδικής Ελαστογραφίας (Transient Elastography)

Πηγή: Η εικόνα σχεδιάστηκε μέσω <https://biorender.com/>

1.2.1 Ο ρόλος των εξωκυτταρικών κυστιδίων

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular vesicles -EVs) αποτελούν μερικούς ετερογενείς πληθυσμούς νανοδομών, οι οποίες προκύπτουν από την κυτταρική μεμβράνη ενός γονικού κυττάρου. Αυτές οι νανοδομές χαρακτηρίζονται από ένα περίβλημα λιπιδικής φύσεως διπλοστιβάδας και διακρίνονται σε διάφορους υποπληθυσμούς με βάση το μέγεθος, το φορτίο «cargo» που μεταφέρουν, καθώς και τον βιογενετικό μηχανισμό με τον οποίον δημιουργούνται. Οι κύριοι υπότυποι βάσει το μέγεθος των των EVs είναι: (i) τα **αποπτωτικά σώματα** (apoptotic bodies) με μέγεθος άνω των 1000 nm, που αποτελεί τη μεγαλύτερη οντότητα των EVs, (ii) τα **μικροκυστίδια** (microvesicles) με μέγεθος μεταξύ 150-1000nm, καθώς και τα **εξωσώματα** (exosomes), που έχουν την μικρότερη διάμετρο

μεταξύ 40-150 nm. Στην Εικ. 5 παρουσιάζονται τα διάφορα μεγέθη των EVs, καθώς και η ποικιλία φορτίων που μπορούν να μεταφέρουν (Doyle and Wang 2019).

	Εξωσώματα	Μικροκυστίδια	Αποπτωτικά σώματα
Μέγεθος (nm)	40-150	150-1000	>1000
			
Φορτία	 DNA  mRNA  miRNA  lncRNA  λιπίδια  αυτοφαγόσωμα  διαλυτές πρωτεΐνες  υποδοχείς		

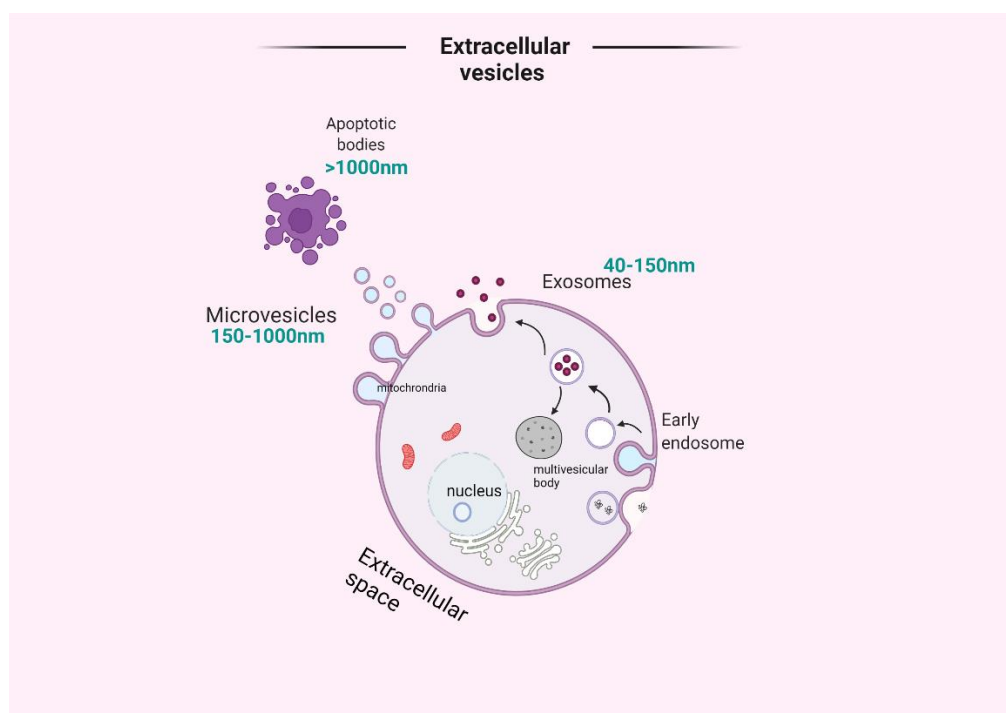
Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση διαφόρων μεγεθών των EVs και των φορτίων που μπορούν να μεταφέρουν. Πηγή: Η εικόνα σχεδιάστηκε μέσω <https://biorender.com/>

Τα EVs μπορούν να μεταφέρουν μια μεγάλη ποικιλία μορίων-φορτίων όπως μόρια DNA, RNA μορίων, συμπεριλαμβανομένων των μορίων αγγελιοφόρου RNA (mRNA), βραχύ μη κωδικοποιητικό (miRNA) και μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA (lncRNA), λιπίδια, διαλυτές πρωτεΐνες, όπως επίσης αυτοφαγοσώματα και διάφορους υποδοχείς. Τα EVs απελευθερώνονται στην συστηματική κυκλοφορία και αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς στα κύτταρα - παραλήπτες σε μακρινούς ή κοντινούς στόχους. Τα κύτταρα στόχοι προσλαμβάνουν τα EVs με ποικίλους τρόπους, είτε μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων με συνοδό επαγωγή των οδών σηματοδότησης, είτε μέσω φαγοκυττάρωσης, ενδοκυττάρωσης ή πινोकύτωσης (Akbar et al. 2019).

1.2.2 Η προέλευση των EVs

Ο βιογενετικός μηχανισμός των εξωκυτταρικών κυστιδίων είναι διαφορετικός για κάθε υπότυπο. Τα αποπτωτικά σώματα παράγονται έπειτα από την απόπτωση του γονικού κυττάρου και προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα, τα οποία τα αναγνωρίζουν από την παρουσία την πρωτεΐνης Annexin V. Κατά την εκβλάση της κυτταρικής μεμβράνης προς το εσωτερικό του κυττάρου, παράγονται τα πρώιμα ενδοσώματα τα οποία ενσωματώνονται με τα φορτία «cargoes» και αποτελούν τα ενδοαυλικά κυστιδία

(intraluminalvesiclesή ILVs). Κάποια από αυτά τα ενδοαυλικά κυστίδια προορίζονται για αποδόμηση στα λυσοσώματα, ενώ άλλα ενώνονται και σχηματίζουν το λεγόμενο πολυκυστιδιακό σωματίο (multivesicular body). Έπειτα από την περαιτέρω ενσωμάτωση των πολυκυστιδικών σωματίων, παράγονται τα εξωσώματα. Βασικός παράγοντας για την διαδικασία της δημιουργίας ενδοσωμάτων είναι το σύμπλοκο των πρωτεϊνών Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT), τα ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, και ESCRT-III, καθώς και άλλες πρωτεΐνες όπως η VPS4, ALIX και το γονίδιο ευαισθησίας όγκου 101. Σε αντίθεση με τα εξωσώματα, τα μικροκυστίδια προκύπτουν από την έξω εκβλάση της κυτταρικής μεμβράνης (Εικ.6). Τέλος αξίζει να σημειωθεί η σχέση μεταξύ της αυτοφαγίας και της παραγωγής EVs, η οποία επάγεται για να αυξηθεί η απομάκρυνση των φορτίων μέσω της απελευθέρωσης των EVs (Abels and Breakefield 2016).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση διαφόρων μεγεθών των EVs και του μηχανισμού σχηματισμού τους. Πηγή: Η εικόνα σχεδιάστηκε μέσω <https://biorender.com/>

1.2.3 Μορφολογικός σχηματισμός EVs

Η παρουσία του φορτίου πρωτεΐνης αποτελεί βασικό δείκτη για την αναγνώριση και τον μορφολογικό χαρακτηρισμό των EVs. Κάποιοι από τους βασικούς δείκτες αποτελούν οι

τετρασπανίνες, όπως η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (HSP70), CD9, CD63, ALG-2 αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη X (ALIX), καθώς και ως CD81, αννεξίνη V και γονίδιο ευαισθησίας όγκου 101 (TSG101). Τα αποπτωτικά σώματα, αποτελούν την πλειοψηφία των παραγόμενων EVs κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, τα οποία εμπεριέχουν το περιεχόμενο του γονικού κυττάρου που υπόκειται στην διαδικασία απόπτωσης. Η διαδικασία παραγωγής των αποπτωτικών σωμάτων πραγματοποιείται μέσω της δημιουργία εξογκωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ τα αποπτωτικά σώματα στην συνέχεια φαγοκυτταρώνονται. Ο ρόλος των αποπτωτικών σωμάτων κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικός, εφόσον έχει αναδειχθεί ότι εμπλέκονται στην εμφάνιση καρκινογένεσης και αυτοάνοσων νοσημάτων. Η μεσαία σε μέγεθος κατηγορία, αποτελεί τα μικροκυστίδια τα οποία προκύπτουν από αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και την εκβλάστηση της μεμβράνης. Ο αριθμός των παραγόμενων μικροκυστιδίων είναι άμεσα συνδεδεμένο με την κατάσταση του μικροπεριβάλλοντος του γονικού κυττάρου. Τέλος, τα εξωσώματα παράγονται από ποικίλα κύτταρα και εκκρίνονται στα βιολογικά υγρά (Veziroglu and Mias 2020).

1.2.4 Εξωκυτταρικά κυστίδια και NASH

Μια πλειθώρα διαφορετικών κυττάρων εμπεριέχονται στο ηπατικό παρέγχυμα, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων, που αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων, τα ηπατικά μακροφάγα Kupffer, των ανοσοκυττάρων, ηπατικών αστεριών και ημιτονοειδών ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα παραπάνω κύτταρα αποτελούν τα γονικά από τα οποία απελευθερώνονται τα EVs υπό συγκεκριμένες συνθήκες όπως σε στρεσογόνες περιπτώσεις για τα κύτταρα. Τέτοια συνθήκη αποτελεί η λιποτοξικότητα, που επιφέρει την ηπατοκυτταρική βλάβη και την ανάπτυξη ηπατοπαθειών όπως η NASH. Η λιποτοξικότητα αποτελεί αποτέλεσμα της εναπόθεσης λιπιδίων στο ηπατικό παρέγχυμα, όπως για παράδειγμα κεραμιδίων, σφιγγολιπιδίων και χοληστερόλης. Στρες για το ηπατοκύτταρο αποτελεί και η υπερπληθώρα των κυκλοφορούντων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Το ηπατοκύτταρο απελευθερώνει μία μεγάλη ποσότητα EVs τα οποία αλληλεπιδρούν με διάφορα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα. Αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η άυσηση της ινωτικής βλάβης, της αγγειογένεσης και την φλεγμονώδους αντίδρασης που συμβάλουν στην εξέλιξη της NAFL σε NASH, κίρρωση και ΗΚΚ. Τα αποπτωτικά σώματα εκφράζουν την

Annexin V, η οποία αναγνωρίζεται από τα μακροφάγα και προκαλείται η επιδείνωση της φλεγμονώδους αντίδρασης και η απελευθέρωση προφλεγμονώδων κυτταροκινών. Τα EVs αλληλεπιδρούν με τα κολλοειδή (sinusoidal) ενδοθηλιακά κύτταρα και εντείνουν την αγγειογένεση, με τους πυλαίους ινωδοβλάστες και τα αστεροειδή κύτταρα με δημιουργία και επιδείνωση της ίνωτικής βλάβης. Επιπροσθέτως, μία ενδιαφέρουσα μελέτη αποτελεί αυτή του Srinivas et al., 2020, η οποία ανέδειξε ότι τα ηπατοκύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή κυκλοφορούντων EVs.

Η πρόοδος της νόσου είναι στενά συνδεδεμένη με τις αλλαγές όχι μόνο στην ποσότητα των EVs, αλλά και στην φύση των φορτίων που μεταφέρουν. Υπό συνθήκες λιποτοξικότητας, ο αριθμός των παραγόμενων EVs παρουσιάζει αισθητή αύξηση, προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση, αγγειογένεση, καθώς και ίνωτικές βλάβες. Τα ηπατοκύτταρα, αποτελούν την κύρια πηγή EVs στην συστηματική κυκλοφορία, όπως έχει αναδειχθεί από πληθώρα μελετών. Μέσω της υπερπαραγωγής EVs, της επακόλουθης φλεγμονώδους αντίδρασης και της απελευθέρωσης προφλεγμονώδων κυττοκινών, επέρχεται σταδιακά η πρόοδος της ηπατοκυτταρικής βλάβης με την μετάβαση από NAFLD σε στεατοηπατίτιδα (NASH) με ή χωρίς παρουσία ίνωσης (Dorairaj et al. 2020, Hernández et al. 2020, Eguchi and Feldstein 2018).

1.2.6 Εξωκυτάρια κυστίδια ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες για την NASH

Η παρουσία, καθώς και ο συνολικός αριθμός των EVs μπορούν εν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες για τον χαρακτηρισμό της σοβαρότητας της νόσου. Όπως για όλες οι χρόνιες ηπατικές νόσοι απαιτείται η λήψη βιοψτικού υλικού. Παρ'όλα αυτά αποτελεί μία επεμβατική μέθοδος ελοχεύει επιπλοκές. Η εύρεση λιγότερο επεμβατικών μεθόδων για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της νόσου κρίνεται αναγκαία.

Τα κυκλοφορούντα ηπατικής προέλευσης EVs αποτελούν πιθανούς βιοδείκτες, οι οποίοι μπορούν επιλεκτικά να απομονωθούν και να χαρακτηριστούν βάσει του φορτίου τους.

Βάσει μελετών χρήσιμοι βιοδείκτες αποτελούν τα EVs που φέρουν βραχύ μη κωδικοποιητικό microRNA -192-5p, τα οποία χαρακτηρίζονται ως την λεγόμενη «υγρή βιοψία» για την εξέλιξη της σοβαρότητας της NAFLD. Κάποια άλλα microRNAs αποτελούν το miR-128-3p, καθώς και το miR-122, τα οποία έχουν ανευρεθεί σε μεγάλη συγκέντρωση σε άτομα με NASH, σε αντίθεση με τους υγιείς μάρτυρες (Newman et al. 2022).

1.2.7 Μέθοδοι απομόνωσης EV

Υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι διαχωρισμού EV, όπως η Υπερφυγοκέντρηση (ultracentrifugation), η Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους [(SEC) (Size-exclusion chromatography)], καθώς και οι διαδικασίες σύλληψης ανοσοσυγγένειας (Immunoaffinity capture -based techniques). Κατά την πρώτη τεχνική ο διαχωρισμός γίνεται βάση του μεγέθους, σχήματος και της πυκνότητας, αποτελεί μέθοδο χαμηλού κόστους και μεγάλης αναπαραγωγιμότητας. Παρόλα αυτά είναι μία σχετικά εργώδης μέθοδος απομόνωσης που μπορεί να αλλοιώσει τα αποτελέσματα, καθώς και υπάρχει ο κίνδυνος αλλαγής της μορφολογίας των EVs. Επίσης η τεχνική αφορά μικρής κλίμακας μελέτες, ενώ μαζί με την απομόνωση των EVs, απομονώνονται επίσης διαλυτά σωματίδια, όπως λιποπρωτείνες και πρωτείνες. Η SEC βασίζεται στο διαχωρισμό EVs, μέσω χρωματογραφίας διαπέρασης γέλης βάσει του μεγέθους των κυστιδίων, ενώ κατά την διαδικασία σύλληψης ανοσοσυγγένειας απομονώνονται μέσω της τεχνικής ανοσοκαθίζησης που αποτελείται από από μαγνητικά σφαιρίδια συζευγμένα με ειδικά αντισώματα για τα EVs, όπως CD9, CD69 και CD81, η οποία θεωρείται ιδανική για μεγάλης απόδοσης μελέτες. Ωστόσο, ένας από τους περιορισμούς της αποτελεί το υψηλό της κόστος. Τέλος κάποιες άλλες τεχνικές απομόνωσης νανοσωματιδίων αποτελούν η τεχνική της μονοφασικής χρωματογραφίας πεδίου ασύμμετρης ροής (asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)), η τεχνική μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (scanning electron microscopy (SEM)), όπως επίσης και η τεχνική Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic light scattering (DLS)) (Brennan et al. 2020, Bachurski et al. 2019, Crescitelli, Lässer, and Lötvall 2021).

1.2.8 Υπερφερριτιναιμία και NASH

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει την φερριτίνη ως πιθανό βιοδείκτη για την πρόβλεψη της ύπαρξης στεατοηπατίτιδας. Έχει παρατηρηθεί σε πολλούς ασθενείς η ύπαρξη υψηλών επιπέδων φερριτίνης ορού (1/3 των περιπτώσεων NAFLD). Η αλλαγές στα επίπεδα της φερριτίνης είναι απόρεια της διαταραγμένης μεταφοράς του σιδήρου, όπως έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με φλεγμονώδη αντίδραση, στεάτωση, καθώς και αντίσταση στην ινσουλίνη. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η αύξηση στα επίπεδα της φερριτίνης στην NAFLD δεν πρέπει να συσχετισθεί με μία αντίδραση οξείας φάσης, είτε με

την ενεργότητα της νόσου. Η διαταραχή στα επίπεδα της φερριτίνης έχουν στενά συνδεδεθεί με αυτά της ορμόνης που ρυθμίζει τον μεταβολισμό του σιδήρου, της λεγόμενης αιψιδίνης, καθώς και με τα επίπεδα του σιδήρου στο ήπαρ των ασθενών. Έχουν αναγνωριστεί μία πολυπαραγοντική αιτιοπαθογένεια για το παραπάνω φαινόμενο της υπερφερριτιναιμίας σε αυτούς τους ασθενείς, όπως η διαταραχή της αντίστασης στην ινσουλίνη, αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες και του διαταραγμένου μεταβολισμού των λιπιδίων και εναπόθεσης του στο ηπατικό παρέγχυμα. Αξίζει να σημειωθεί πως είναι απαραίτητος ο αποκλεισμός άλλων αιτιών αύξησης των επιπέδων σιδήρου και φερριτίνης, όπως η αιμοχρωμάτωση (σε ετερόζυγα άτομα ή ασυμπτωματικά ομόζυγα) που οφείλεται σε γενετικές ανωμαλίες με συχνές μεταλλάξεις στη θέση 63,65 και 282 του γονιδίου HFE. Άλλες μη συχνές γονιδιακές μεταλλάξεις αποτελούν αυτές των L- / H- Ferritin, Hemojuvelin IIA, transferrin receptor 2 III, Hpcidin IIB και Ferroportin 1 (IV type) ((Barros et al. 2017, Modares Mousavi et al. 2018).

Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Σκοπός του ερευνητικού έργου

Στην έρευνα μας θα αξιολογήσουμε αιματολογικές παραμέτρους, ιδίως τα επίπεδα φερριτίνης και την ύπαρξη εξωκυτταρικών κυστιδίων για τη διάγνωση ασθενών με NASH ως μη επεμβατικούς διαγνωστικούς βιοδείκτες (αριθμός και μέγεθος αυτών) και θα συσχετίσουμε τα δεδομένα αυτά με την παράμετρο εξασθένησης υπερήχων (UAP) ως προς την σοβαρότητα της νόσου.

2.1.2 Πληθυσμός και συλλογή δειγμάτων

Για τη μελέτη αυτή έγινε επιλογή 32 ασθενών άνδρες ή γυναίκες που προσήλθαν στο ηπατολογικό ιατρείο μετά από υπερηχογραφικό έλεγχο που ανέδειξε εικόνα λιπώδους διήθησης, έχοντας BMI >25 ή BMI <25, καθώς και 5 υγιών δοτών. Έγινε αποκλεισμός των ασθενών που έπασχαν από μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη και άλλα σοβαρά συνοδά νοσήματα όπως ηπατίτιδες, καρκίνο, φλεγμονώδη νοσήματα, διότι αυτά αποτελούν κύρια πηγή κυκλοφορούντων Evs, τα επίπεδα των οποίων μπορούν να προκαλέσουν σφάλματα κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ενώ κατά την διάρκεια της συλλογής δειγμάτων δύο ασθενείς αποκλείστηκαν λόγω πρόσφατης διάγνωσης σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.

Έπειτα από ενυπόγραφη συγκατάθεση όλων των δοτών για τη συμμετοχή τους στη μελέτη και ενημέρωσή τους για τη χρονική διάρκεια της μελέτης και για τη δυνατότητα να αποσυρθούν οποιαδήποτε στιγμή το επιθυμούν, έγινε συλλογή αιματολογικών και βιοχημικών δεδομένων (πχ. λιπιδαιμικό προφίλ, ηπατικό προφίλ, φερριτίνη) των τελευταίων τριών μηνών πριν από την αιμοληψία και νέα αιμοληψία για την διενέργεια αξιολόγησης των παραγόντων πήξης, της παρουσίας εξωκυτταρικών κυστιδίων, όπως και άλλοι αιματολογικοί παράγοντες με ιδιαίτερη έμφαση στη φερριτίνη. Ελήφθησαν 10 ml ολικού αίματος από τους ασθενείς και υγιείς δότες τα οποία τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια με κιτρικό νάτριο και EDTA αντιπηκτικό. Άμεσα μετά την αιμοληψία τοποθετήθηκαν σε ειδικές συνθήκες για την ασφαλή μεταφορά τους στο εργαστήριο και την αποφυγή αλλοίωσης τους (εντός 1-1,5 ώρας).

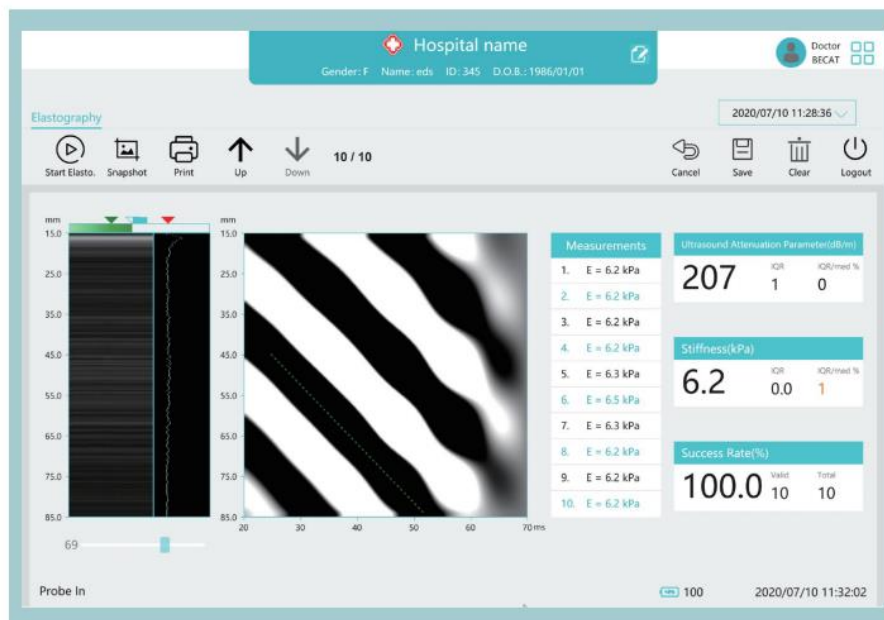
2.1.3 Ελαστογραφία ήπατος και μέτρηση παράγοντα UAP

Στην επιστημονική έρευνα γίνεται χρήση φορητού συστήματος υπερήχων με τη μέθοδο παροδικής ελαστογραφίας (transient elastography TE) SMEDA LT P1 (SMEDA Medical Co.,Ltd.) με χαρακτηριστικά που αναφέρονται στην Εικόνα., όπου γίνεται υπολογισμός και ποσοτικοποίηση της λιπώδους διήθησης-στεάτωσης, καθώς και της ίνωσης του ήπατος μέσω του υπολογισμού ultrasound attenuation parameter (UAP) and liver stiffness measurement (LSM), αντιστοίχως (Εικ 7,8). Η καταγραφή των μετρήσεων ακολουθούσαν τις κατευθυντήριες οδηγίες από την World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology (WFUMB) ως αναφορά την στάση του ασθενούς, την τοποθέτηση του ηχοβολέα και την επιλογή των επιτυχημένων μετρήσεων. Συγκεκριμένα γίνονται αποδεκτά τα αποτελέσματα μετά από 10 ή παραπάνω μετρήσεις με τον λόγο μεταξύ των επιτυχών προς τον συνολικό αριθμό των μετρήσεων να είναι ίσο ή πάνω από το 60%, καθώς και ο λόγος μεταξύ του interquartile range (IQR) προς του LSM να είναι μικρότερο ή ίσο με το 30% που ισοδυναμεί με την μεταβλητότητα των μετρήσεων. Η κεφαλή στο συγκεκριμένο ελαστογράφο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε άτομα παχύσαρκα, χωρίς να απαιτείται η αλλαγή της κεφαλής του ηχοβολέα. Τέλος, οι μετρήσεις έγιναν με την βοήθεια pedal και όχι με το κουμπί στην κεφαλή του ηχοβολέα για μείωση των αποτυχημένων λήψεων λόγω παρεκβολής οστικών δομών. Τέλος, τα όρια στεάτωσης με τον υπολογισμό του μεγέθους UAP ήταν: $\geq S3$ τα 296dB/dl, $\geq S2$ τα 269dB/dl και $\geq S1$ τα 244dB/dl.



Εικόνα 7. Ελαστογράφος για μέτρηση UAP,LSM

Πηγή εικόνας: <https://smedamedical.com/post/2/8>



Εικόνα 7. Παράδειγμα μετρήσεων και εικόνας επιτυχημένου ελαστογραφήματος

Πηγή εικόνας: <https://smedamedical.com/post/2/8>

Applied Technology	Transient Elastography (TE)
Examination Method	Probe touch detection
Data Processing	Optimized scientific algorithms
Fibrosis Scanning Probe	Dynamic wideband frequency, real-time transmitting and receiving ultrasonic waves, controlled low-frequency shear wave
Functions	Liver Stiffness Measurement (LSM) Ultrasound Attenuation Parameter (UAP)
Hardware	12.3" high-resolution touchscreen LCD monitor 4GB internal memory 70G storage space (128G hard disk) 2×USB 2.0 ports 1×MiniDP ports Foot switch
Power	AC power, 100V~240V, 47~63Hz

Εικόνα 9. Χαρακτηριστικά SMEDA LT F1 ελαστογράφου

Πηγή εικόνας: <https://smedamedical.com/post/2/8>

2.2.4 Ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων -EVs (NTA)

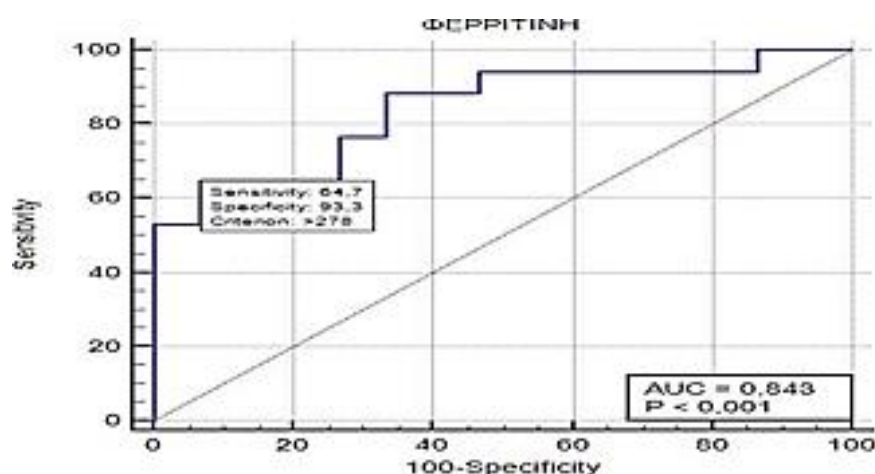
Μέσω του οργάνου Panalytic NanoSight, θα γίνει η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)) ώστε να χαρακτηριστούν τα νανοσωματίδια από 10nm - 1000nm* εντός του βιολογικού υγρού. Θα γίνει άμεση παρατήρηση των σωματιδίων μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου καθώς και μέτρηση των γεγονότων διάχυσης. Αυτή η ανάλυση θα δώσει δεδομένα ως προς την συγκέντρωση, την κατανομή, το μέγεθος των σωματιδίων, καθώς θα γίνει και άμεση παρατήρηση αυτών μέσω φθορισμού. Τα πλάσματα των ασθενών μελετήθηκαν μετά από αραιώση 1:1000 για καλύτερη παράτηρηση των κυστιδίων λόγω της αυξημένης πυκνότητάς τους εντός του βιολογικού υγρού.

2.2.5 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων θα χρησιμοποιηθεί το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 22.0). Ως στατιστικά σημαντικά θα θεωρηθούν τα αποτελέσματα με $P < 0,05$ ή $P < 0,01$.

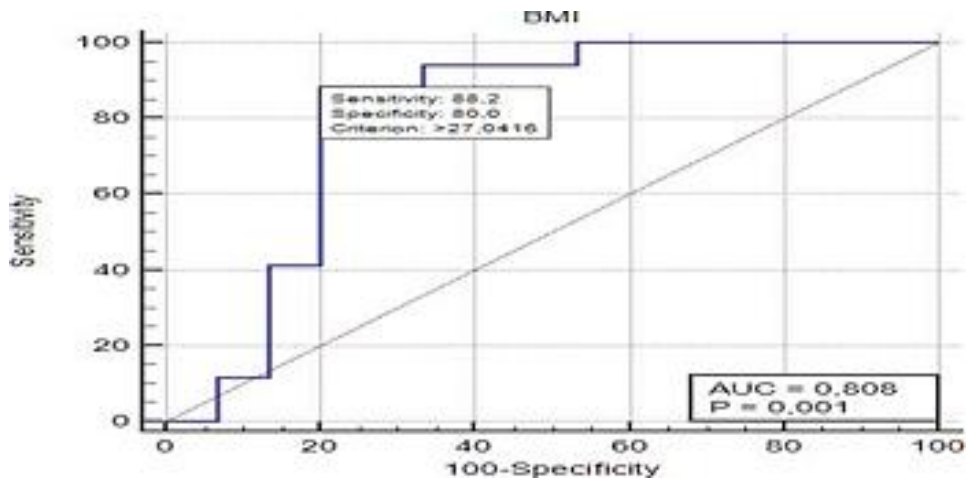
Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα

Στα πλαίσια διερεύνησης της συσχέτισης των επιπέδων φερριτίνης επιλέχθηκαν 32 ασθενείς, από τους οποίους οι 56,5% άνδρες 56.5% με μέσης ηλικία τα 55.41 ± 10.8 έτη που προσήλθαν στο ηπατολογικό ιατρείο λόγω ανεύρεσης λιπώδους διήθησης σε προηγούμενο υπερηχογραφικό έλεγχο. Από τους παραπάνω 16 (50%) ασθενείς είχαν αυξημένη τιμή φερριτίνης (μέση τιμή $256.72 \pm 180.86 \text{ ng/ml}$) ενώ οι 17 (53%) είχαν κάποιου βαθμού στεάτωση σύμφωνα με το UAP. 15 (46.8%) ασθενείς είχαν ταυτόχρονα στεάτωση και αυξημένα επίπεδα φερριτίνης. Η συνολική διαγνωστική ακρίβεια των επιπέδων φερριτίνης στην καμπύλη ROC-AUC ήταν 0.843 (95% CI: 0.671-0.947, $p < 0.0001$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο $>278 \text{ ng/ml}$ (ευαισθησία 64.7% και ειδικότητα 93.3%) (βλ. Διάγραμμα 1), του BMI ήταν 0.808 (95% CI: 0.63-0.925, $p = 0.0005$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο >27.04 (ευαισθησία 88.2% και ειδικότητα 80%) (βλ. Διάγραμμα 2) και του HSI ήταν 0.731 (95% CI: 0.546-0.872, $p = 0.0097$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο >40.9 (ευαισθησία 70.6% και ειδικότητα 73.3%) (βλ. Διάγραμμα 3). Στη λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης τα επίπεδα φερριτίνης (OR: 1.0124, 95% CI: 1.002-1.023, $p = 0.0199$) και το BMI (OR: 1.4166, 95% CI: 1.0153-1.9766, $p = 0.0404$) αποτελούσαν προγνωστικούς δείκτες στεάτωσης με βάση το UAP. Τέλος, τα μέσα επίπεδα φερριτίνης ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με στεάτωση βαρύτητας S3 σε σχέση με αυτούς με S1 (454.83 ng/ml vs. 228 ng/ml , $p = 0.044$). Παρακάτω παραθέτουμε τα διαγράμματα που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση των επιπέδων Φερριτίνης σε σχέση με τα μεγέθη UAP και τον πίνακα που προκύπτει από τη λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης.



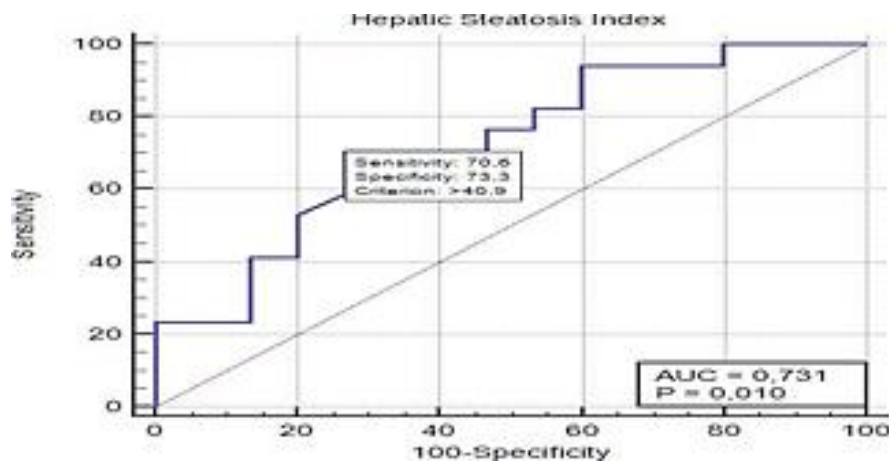
Διάγραμμα 1. Η συνολική διαγνωστική ακρίβεια των επιπέδων φερριτίνης.

Στην καμπύλη ROC-AUC ήταν 0.843 (95% CI: 0.671-0.947, $p < 0.0001$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο $>278\text{ng/ml}$ (ευαισθησία 64.7% και ειδικότητα 93.3%).



Διάγραμμα 2. Η διαγνωστική ακρίβεια του BMI.

Στην καμπύλη ROC-AUC ήταν 0.808 (95% CI: 0.63-0.925, $p = 0.0005$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο >27.04 (ευαισθησία 88.2% και ειδικότητα 80%).



Διάγραμμα 3. Η διαγνωστική ακρίβεια του HSI.

Στην καμπύλη ROC-AUC ήταν 0.731 (95% CI: 0.546-0.872, $p = 0.0097$) με βέλτιστο διαγνωστικό όριο >40.9 (ευαισθησία 70.6% και ειδικότητα 73.3%).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης.

	Odds ratio	95% CI	p value
BMI	1.4166	1.0153 to 1.9766	0.0404
ΦΕΡΡΙΤΙΝΗ	1.0124	1.0020 to 1.0230	0.0199

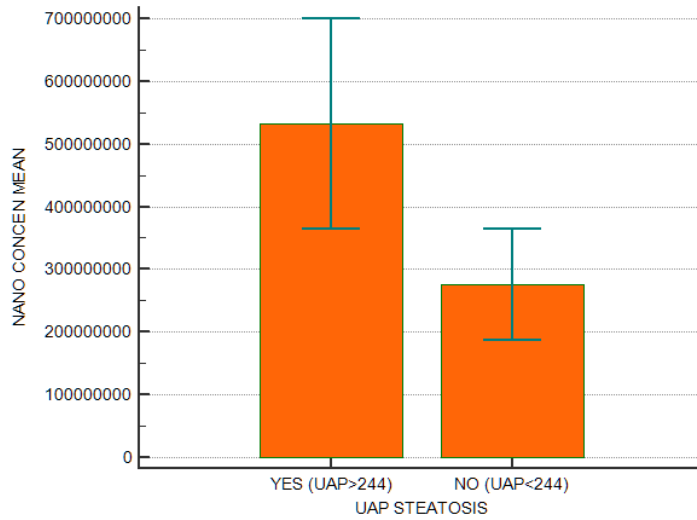
Στα πλαίσια διερεύνησης της συσχέτισης των επιπέδων νανοσωματιδίων σε σχέση με την βαρύτητα της στεάτωσης , μελετήσαμε n=26 ασθενείς με μέση ηλικία 55±11 έτη, εκ των οποίων το 46%(12) ήταν άντρες και το 54% (14) γυναίκες με μέση τιμή UAP, dB/m 251±48 , LSM, kPa 11.4±16 και έχοντας BMI, Mean±SD 27.36±3.7. Εκ της μέτρησης της μέσης πυκνότητας νανοσωματιδίων στο πλάσμα των παραπάνω ασθενών προκύπτει ότι είχαν μέσο όρο 4.04e+12±2.54e+13 Concentration (particles/ml) .

Εκ των εργαστηριακών αποτελεσμάτων και της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει συσχέτιση της ύπαρξης στεάτωσης (UAP ≥244) με την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων κυστιδίων στο πλάσμα των ασθενών, με την μέση πυκνότητα των κυστιδίων να είναι μεγαλύτερη στα άτομα με UAP≥244. Επιπλέον η βαρύτητα της στεάτωσης ήταν ανάλογη των επιπέδων των κυστιδίων με σημαντικά αυξημένα επίπεδα στις περιπτώσεις με S3 βαθμού στεάτωσης, που υποδηλώνει έντονη φλεγμονή στο ηπατικό παρέγχυμα. Η μέση πυκνότητα των κυστιδίων ήταν μεγαλύτερη στα άτομα με UAP≥296 (S3). Μικρή διαφορά παρατηρήθηκε στα άτομα με S1-S2.

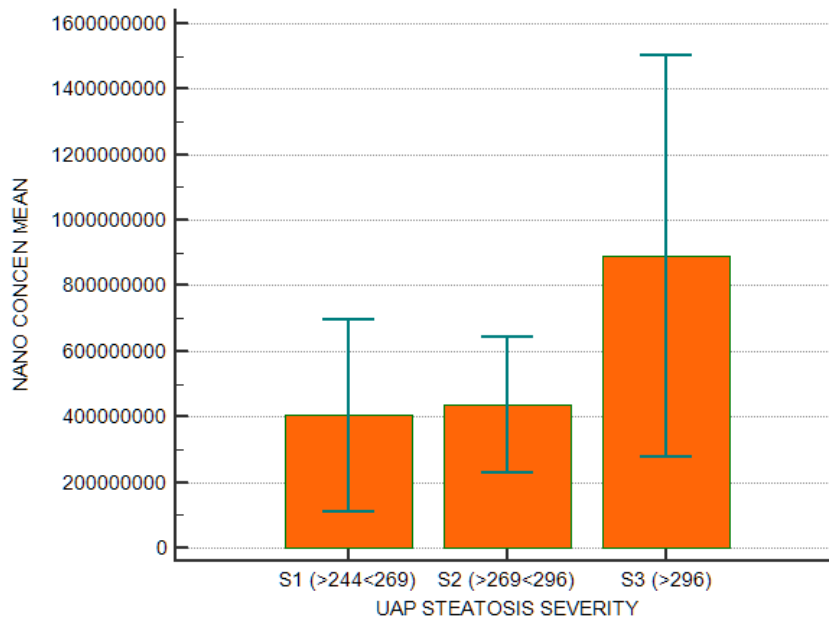
Χαμηλά επίπεδα παρατηρήθηκαν στα controls και στα άτομα χωρίς στεάτωση , ενώ παρατηρήθηκε όχι σημαντική διαφορά στα επίπεδα των κυστιδίων για τις κατηγορίες S1 και S2. Η συσχέτιση του μεγέθους των κυστιδίων με την βαρύτητα της στεάτωσης δεν απεδείχθη στατιστικά σημαντική. . Η καμπύλη ROC ανέδειξε την μέτρηση της μέσης πυκνότητας των κυστιδίων στο πλάσμα ως μέθοδο συσχέτισης της βαρύτητας της στεάτωσης – μεγέθους UAP με την μέση πυκνότητα των κυστιδίων με ευαισθησία 92,3% και ειδικότητα 69,2%.

Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί με την χρήση αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών που εκφράζουν σχεδόν αποκλειστικά τα ηπατοκύτταρα.

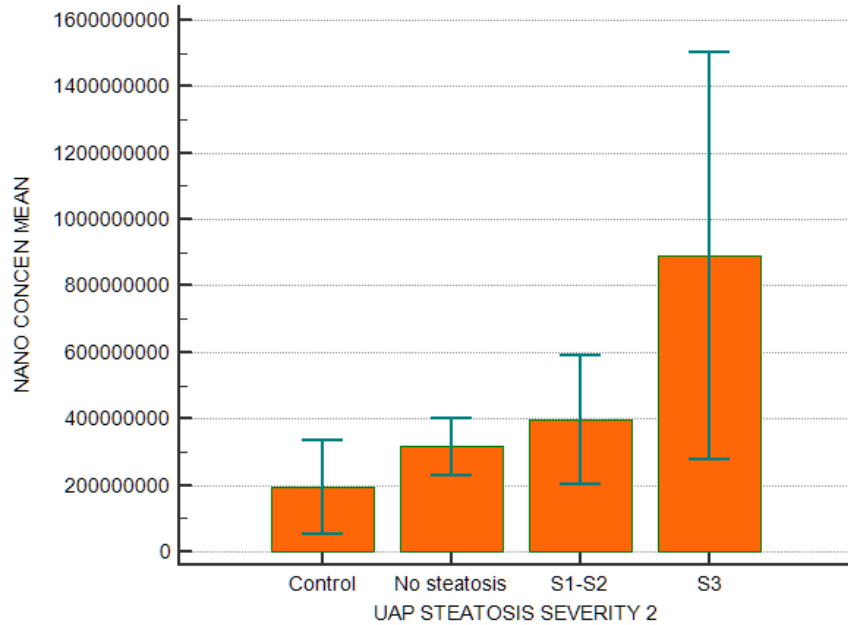
Αυτός είναι και ο βασικός περιορισμός αυτής της μελέτης στην οποία δεν έγινε χαρακτηρισμός των κυστιδίων ως προς την προέλευση τους . Ωστόσο , μέσω της αυστηρής εκλογής των ασθενών αποκλείσαμε άλλες παραμέτρους που συντελούν στην αυξημένη παραγωγή κυστιδίων.



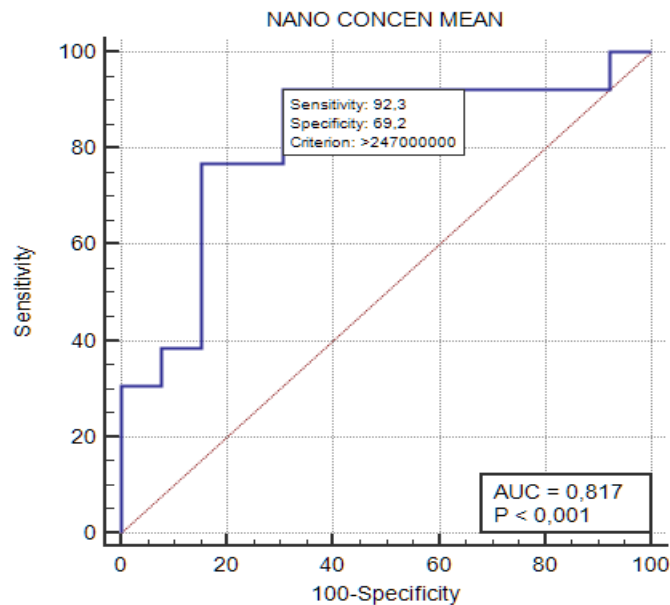
Διάγραμμα 4. Η συσχέτιση UAP με την μέση πυκνότητα των κυστιδίων. Η μέση πυκνότητα των κυστιδίων ήταν μεγαλύτερη στα άτομα με $UAP \geq 244$.



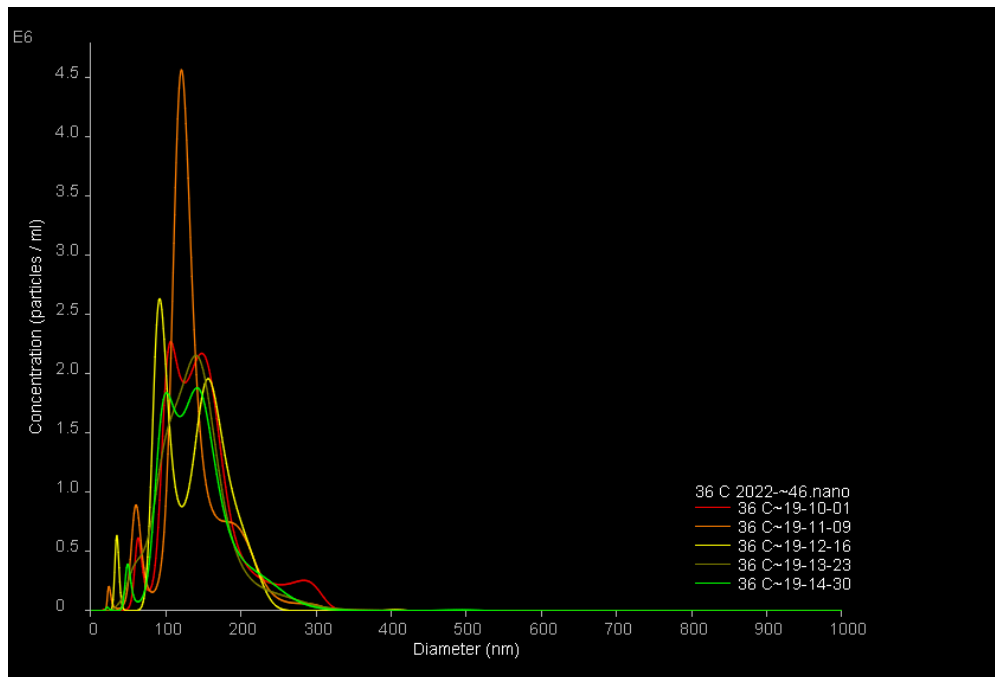
Διάγραμμα 5. Η συσχέτιση της βαρύτητας της στεάτωσης – μεγέθους UAP με την μέση πυκνότητα των κυστιδίων. Η μέση πυκνότητα των κυστιδίων ήταν μεγαλύτερη στα άτομα με $UAP \geq 296$ (S3). Μικρή διαφορά παρατηρήθηκε στα άτομα με S1-S2.



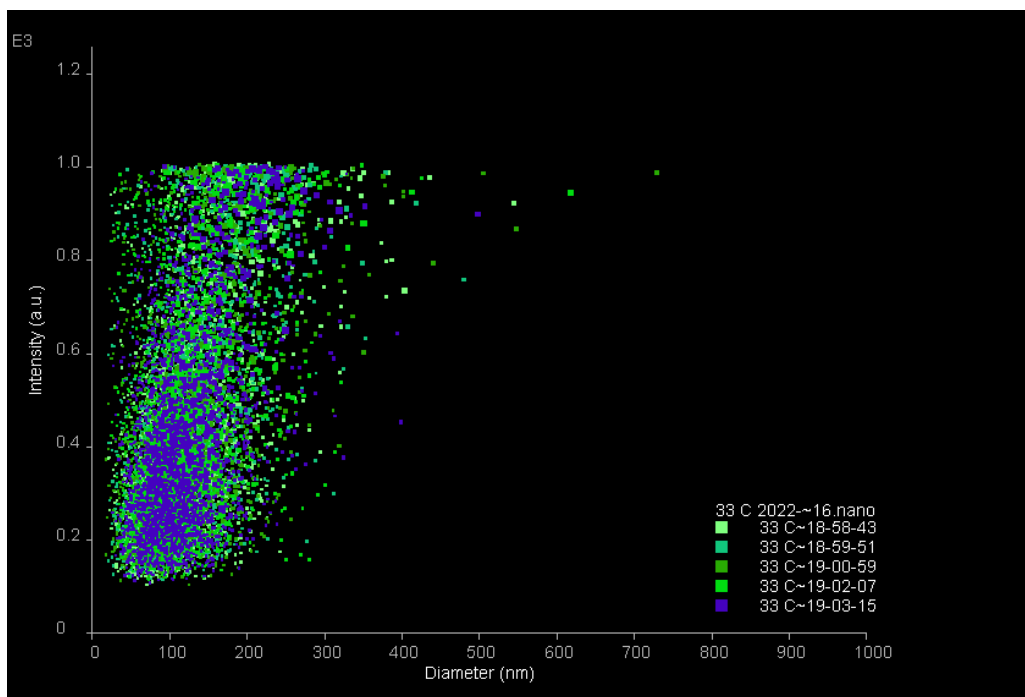
Διάγραμμα 6. Η συσχέτιση της βαρύτητας της στεάτωσης – μεγέθους UAP με την μέση πυκνότητα των κυστιδίων. Η μέση πυκνότητα των κυστιδίων ήταν μεγαλύτερη στα άτομα με UAP \geq 296 (S3). Μικρή διαφορά παρατηρήθηκε στα άτομα με S1-S2. Χαμηλή πυκνότητα κυστιδίων παρατηρήθηκε στα controls και στα άτομα χωρίς στεάτωση.



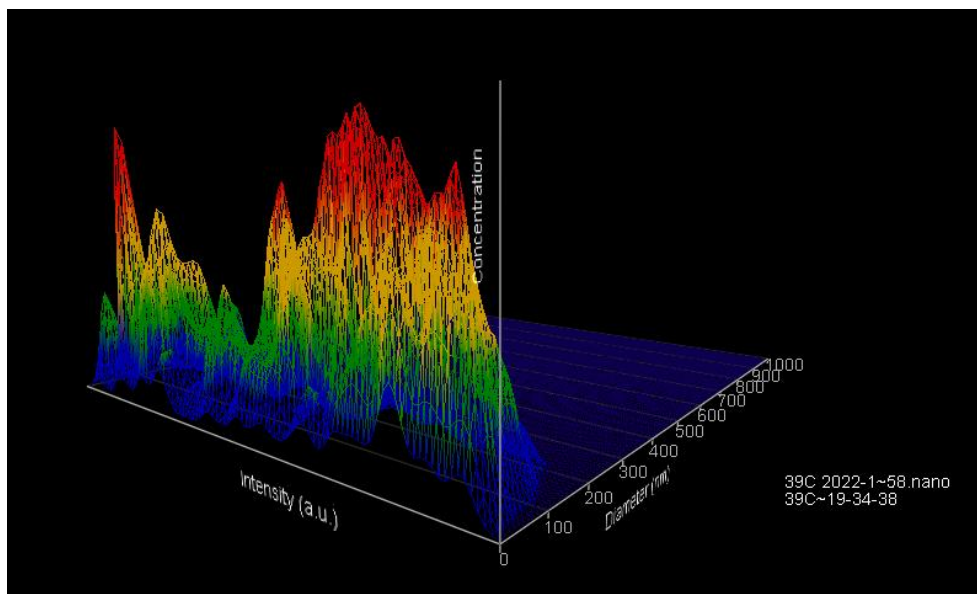
Διάγραμμα 7. Η καμπύλη ROC ανέδειξε την μέτρηση της μέσης πυκνότητας των κυστιδίων στο πλάσμα ως μέθοδο συσχέτισης της βαρύτητας της στεάτωσης – μεγέθους UAP με την μέση πυκνότητα των κυστιδίων με ευαισθησία 92,3% και ειδικότητα 69,2%.



Διαγράμμα 8. Διαγράμματα συσχέτισης μεγέθους (διαμέτρος- πυκνότητα) για κάθε απόσπασμα που έχει καταγραφεί.



Διαγράμμα 9. Scatter plot συσχέτισης μεγέθους (διαμέτρος-έντασης) για κάθε απόσπασμα που έχει καταγραφεί.



Διαγράμμα 10. 3D Διάγραμμα συσχέτισης μεγέθους (διαμέτρος) – πυκνότητας-έντασης .

Πίνακας 2. Σύνοψη στατιστικών αποτελεσμάτων p-values και Μέσης πυκνότητας σωματιδίων

	Control	No steatosis	S1-S2	S3
Mean Con- cen- tra- tion± SD, parti- cles/ ml	1.9485e8±8.877 3626e7	3.15875e8±1.6123 2286e8	3.97285714e8±2.099 06101e8	8.9e8±2.46178 797e8

	Control vs. No Steatosis	Control vs. S1-S2	Control vs. S3	No Steato- sis vs. S1- S2	No Steatosis vs. S3	S1-S2 vs. S3
p value	0.345	0.038	0.034	0.385	0.007	0.030

Κεφάλαιο 5. Συζήτηση

Η NAFLD θεωρείται η παρουσία στεάτωσης σε περιπτώσεις απουσίας κατάχρησης αλκοόλ. Η παραπάνω νόσος καθίσταται ως μία από τις πιο σύννητες αιίες χρόνιας ηπατοπάθειας διεθνώς. Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται σημαντική άνοδος του επιπολασμού και θεωρείται η δεύτερη πιο συχνή αιτία μεταμόσχευσης ήπατος. Η NAFLD χαρακτηρίζεται ως μία πολυσταδιακή διαδικασία, στην οποία εμπεριέχονται επιμέρους ασθένειες όπως η στεάτωση που ακολουθείται από την NASH που οδηγεί σταδιακά σε ίνωση και κίρρωση του ήπατος, η οποία προδιαθέτει για την ηπατική καρκινογένεση και την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η εύρεση βιολογικών δεικτών για την πρώιμη ανίχνευση της νόσου είναι μείζονος σημασίας. Έχει παρατηρηθεί σε πληθώρα ασθενών στα πλαίσια προληπτικού εργαστηριακού ελέγχου, αύξηση σε αιματολογικούς παράγοντες όπως η Φερριτίνη ορού. Η υπερφερριτιναιμία σχετίζεται βάση πρόσφατων μελετών με ηπατοκυτταρική βλάβη παρά με αιμοχρωμάτωση, υποδηλώνοντας την αξιολόγηση αυτής της παραμέτρου ιδιαίτερης σημασίας σε ασθενείς με NAFLD/NASH. Τα EVs κατέχουν ιδιαίτερη σημασία για το ήπαρ καθώς αλληλεπιδρούν με πολλούς τύπους κυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα και συμμετέχουν στην ανάπτυξη ηπατοπάθειας συμπεριλαμβανομένου της NASH. Κατά το πρώτο σκέλος της μελέτης τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τη σύγκριση των επιπέδων φερριτίνης με το μέγεθος UAP και την βαρύτητα της στεάτωσης μας έδειξαν ότι οι μισοί ασθενείς με στεάτωση έχουν αυξημένα επίπεδα φερριτίνης και ότι τα επίπεδα φερριτίνης μπορούν να βοηθήσουν τόσο στη διάγνωση όσο και στη βαρύτητα της στεάτωσης σε ασθενείς με MAANH , με τα μέσα επίπεδα φερριτίνης να είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με S3 σε σύγκριση με αυτούς S1 και το επίπεδο της ως δείκτης στεάτωσης να έχει ευαισθησία 64.7% . Κατά το δεύτερο σκέλος της μελέτης τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τη σύγκριση των επιπέδων των κυστιδίων με την βαρύτητα της στεάτωσης μας έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα κυστιδίων σχετίζονται με την ύπαρξη στεάτωσης (UAP \geq 244). Τέλος, η βαρύτητα της στεάτωσης ήταν ανάλογη των επιπέδων των κυστιδίων , παρατηρώντας σημαντικά αυξημένα επίπεδα στις περιπτώσεις με S3 βαθμού στεάτωση και μικρές διαφορές στα επίπεδα μεταξύ των ατόμων με S1-S2.

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα

- Οι μισοί ασθενείς με στεάτωση έχουν αυξημένα επίπεδα φερριτίνης
- Τα μέσα επίπεδα φερριτίνης ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με S3 σε σύγκριση με αυτούς S1.
- Τα επίπεδα φερριτίνης ως δείκτης στεάτωσης είχαν ευαισθησία 64.7% .
- Η μελέτη ανέδειξε ότι τα επίπεδα φερριτίνης μπορούν να βοηθήσουν τόσο στη διάγνωση όσο και στη βαρύτητα της στεάτωσης σε ασθενείς με ΜΑΛΝΗ.
- Τα επίπεδα φερριτίνης μπορούν να βοηθήσουν τόσο στη διάγνωση όσο και στη βαρύτητα της στεάτωσης σε ασθενείς με ΜΑΛΝΗ.
- Σχέτιση της ύπαρξης στεάτωσης (UAP ≥ 244) με την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων κυστιδίων στο πλάσμα των ασθενών.
- Επιπλέον η βαρύτητα της στεάτωσης ήταν ανάλογη των επιπέδων των κυστιδίων με σημαντικά αυξημένα επίπεδα στις περιπτώσεις με S3 βαθμού στεάτωσης.
- Μικρή διαφορά παρατηρήθηκε στα άτομα με S1-S2.
- Η μέτρηση της μέσης πυκνότητας των κυστιδίων στο πλάσμα ως μέθοδο συσχέτισης της βαρύτητας της στεάτωσης – μεγέθους UAP έχει ευαισθησία 92,3% και ειδικότητα 69,2%.

Αναφορές

- Abels, Erik R., and Xandra O. Breakefield. 2016. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36 (3): 301–12. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>.
- Akbar, Naveed, Valerio Azzimato, Robin P. Choudhury, and Myriam Aouadi. 2019. Extracellular Vesicles in Metabolic Disease. *Diabetologia* 62 (12): 2179–87. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-05014-5>.
- Amernia, Behnaz, Seyed Hamid Moosavy, Fatemeh Banookh, and Ghazal Zoghi. 2021. FIB-4, APRI, and AST/ALT Ratio Compared to FibroScan for the Assessment of Hepatic Fibrosis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Bandar Abbas, Iran. *BMC Gastroenterology* 21 (1): 453. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-02038-3>.
- Aron-Wisnewsky, Judith, Chloé Vigliotti, Julia Witjes, Phuong Le, Adriaan G. Holleboom, Joanne Verheij, Max Nieuwdorp, and Karine Clément. 2020. Gut Microbiota and Human NAFLD: Disentangling Microbial Signatures from Metabolic Disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 17 (5): 279–97. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0269-9>.
- Aykut, Umut Emre, Umit Akyuz, Atakan Yesil, Fatih Eren, Fatma Gerin, Rabia Ergelen, Cigdem Ataizi Celikel, and Yusuf Yilmaz. 2014. A Comparison of FibroMeter™ NAFLD Score, NAFLD Fibrosis Score, and Transient Elastography as Noninvasive Diagnostic Tools for Hepatic Fibrosis in Patients with Biopsy-Proven Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49 (11): 1343–48. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.958099>.
- Bachurski, Daniel, Maximiliane Schuldner, Phuong-Hien Nguyen, Alexandra Malz, Katrin S. Reiners, Patricia C. Grenzi, Felix Babatz, et al. 2019. Extracellular Vesicle Measurements with Nanoparticle Tracking Analysis - An Accuracy and Repeatability Comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *Journal of Extracellular Vesicles* 8 (1): 1596016. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596016>.
- Barros, Raffaella K., Helma Pinchemel Cotrim, Carla H. Daltro, and Yanaihara A. Oliveira. 2017. Hyperferritinemia in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Revista Da Associação Medica Brasileira* (1992) 63 (3): 284–89. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.03.284>.
- Brennan, K., K. Martin, S. P. FitzGerald, J. O’Sullivan, Y. Wu, A. Blanco, C. Richardson, and M. M. Mc Gee. 2020. A Comparison of Methods for the Isolation and Separation of Extracellular Vesicles from Protein and Lipid Particles in Human Serum. *Scientific Reports* 10 (1): 1039. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57497-7>.

- Budd, Jeffrey, and Kenneth Cusi. 2020. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: What Does the Primary Care Physician Need to Know? *The American Journal of Medicine* 133 (5): 536–43. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.01.007>.
- Caussy, Cyrielle, Scott B. Reeder, Claude B. Sirlin, and Rohit Loomba. 2018. Noninvasive, Quantitative Assessment of Liver Fat by MRI-PDFF as an Endpoint in NASH Trials. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 68 (2): 763–72. <https://doi.org/10.1002/hep.29797>.
- Crescitelli, Rossella, Cecilia Lässer, and Jan Lötvall. 2021. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicle Subpopulations from Tissues. *Nature Protocols* 16 (3): 1548–80. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00466-1>.
- Dorairaj, Vigneswary, Siti Aishah Sulaiman, Nadiyah Abu, and Nor Azian Abdul Murad. 2020. Extracellular Vesicles in the Development of the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: An Update. *Biomolecules* 10 (11): 1494. <https://doi.org/10.3390/biom10111494>.
- Doyle, Laura M., and Michael Zhuo Wang. 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells (Basel, Switzerland)* 8 (7): 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>.
- Eguchi, Akiko, and Ariel E. Feldstein. 2018. Extracellular Vesicles in Non-Alcoholic and Alcoholic Fatty Liver Diseases. *Liver Research* 2 (1): 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.01.001>.
- Hernández, Alejandra, Juan Pablo Arab, Daniela Reyes, Ainhoa Lapitz, Han Moshage, Jesús M. Bañales, and Marco Arrese. 2020. Extracellular Vesicles in NAFLD/ALD: From Pathobiology to Therapy. *Cells (Basel, Switzerland)* 9 (4): 817. <https://doi.org/10.3390/cells9040817>.
- Li, Xu, Hongqin Xu, and Pujun Gao. 2019. Fibrosis Index Based on 4 Factors (FIB-4) Predicts Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Patients. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 25: 7243–50. <https://doi.org/10.12659/MSM.918784>.
- Long, Michelle T., Sanil Gandhi, and Rohit Loomba. 2020. Advances in Non-Invasive Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism: Clinical and Experimental* 111S (154259): 154259. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154259>.
- M, Ibrahim, Charanjit Singh, M. Ashraf Ganie, and K. Alsayari. 2009. NASH: The Hepatic Injury of Metabolic Syndrome: A Brief Update. *International Journal of Health Sciences* 3 (2): 265–70.
- Ma, Xiong, and Zhiping Li. 2006. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Chinese Journal of Digestive Diseases* 7 (1): 7–11. <https://doi.org/10.1111/j.1443-9573.2006.00237.x>.

- Modares Mousavi, Seyed Reza, Bitra Geramizadeh, Amir Anushiravani, Fardad Ejtehad, Mohammad Hossein Anbardar, and Maryam Moini. 2018. Correlation between Serum Ferritin Level and Histopathological Disease Severity in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Middle East Journal of Digestive Diseases* 10 (2): 90–95. <https://doi.org/10.15171/mejdd.2018.96>.
- Morin, Jeffrey, Terri A. Swanson, Anthony Rinaldi, Magalie Boucher, Trenton Ross, and Dinesh Hirehallur-Shanthappa. 2021. Application of Ultrasound and Shear Wave Elastography Imaging in a Rat Model of NAFLD/NASH. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 170. <https://doi.org/10.3791/62403>.
- Negro, Francesco. 2020. Natural History of NASH and HCC. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 40 Suppl 1 (S1): 72–76. <https://doi.org/10.1111/liv.14362>.
- Newman, Lauren A., Zivile Useckaite, Jillian Johnson, Michael J. Sorich, Ashley M. Hopkins, and Andrew Rowland. 2022. Selective Isolation of Liver-Derived Extracellular Vesicles Redefines Performance of MiRNA Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biomedicines* 10 (1): 195. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010195>.
- Pafili, Kalliopi, and Michael Roden. 2021. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) from Pathogenesis to Treatment Concepts in Humans. *Molecular Metabolism* 50 (101122): 101122. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101122>.
- Parthasarathy, Gopanandan, Xavier Revelo, and Harmeet Malhi. 2020. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatology Communications* 4 (4): 478–92. <https://doi.org/10.1002/hep4.1479>.
- Serra, Joao Tiago, Johannes Mueller, Haidong Teng, Omar Elshaarawy, and Sebastian Mueller. 2020. Prospective Comparison of Transient Elastography Using Two Different Devices: Performance of FibroScan and FibroTouch. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 12: 41–48. <https://doi.org/10.2147/HMER.S245455>.
- Simona Leoni, Francesco Tovoli, Lucia Napoli, Ilaria Serio, Silvia Ferri, Luigi Bolondi. 2018. Current Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review with Comparative Analysis. *World J Gastroenterol*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i30.3361>.
- Trasolini, Roberto, Ben Cox, Ciaran Galts, Eric M. Yoshida, and Vladimir Marquez. 2022. Elevated Serum Ferritin in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Is Not Predictive of Fibrosis. *Canadian Liver Journal* 5 (2): 152–59. <https://doi.org/10.3138/canlivj-2021-0002>.
- Treepasertsuk, Sombat, Einar Björnsson, Felicity Enders, Sompongse Suwanwalaikorn, and Keith D. Lindor. 2013. NAFLD Fibrosis Score: A Prognostic Predictor for Mortality and Liver

Complications among NAFLD Patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 19 (8): 1219–29. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i8.1219>.

Veziroglu, Eren M., and George I. Mias. 2020. Characterizing Extracellular Vesicles and Their Diverse RNA Contents. *Frontiers in Genetics* 11: 700. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00700>.

Younossi, Zobair, Quentin M. Anstee, Milena Marietti, Timothy Hardy, Linda Henry, Mohammed Eslam, Jacob George, and Elisabetta Bugianesi. 2018. Global Burden of NAFLD and NASH: Trends, Predictions, Risk Factors and Prevention. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 15 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>.

Πηγές Εικόνων

Εικόνα 1-3: Προσωπικό αρχείο. Οι εικόνες σχεδιαστήκαν με το <https://biorender.com/>

Εικόνα 4: <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i30.3361>.

Εικόνα 5,6: Προσωπικό αρχείο. Οι εικόνες σχεδιαστήκαν με το <https://biorender.com/>

Εικόνα 7-9: <https://smedamedical.com/post/2/8>