

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# **Steatohepatita nonalcoolică. Aspecte patogenetice și riscul cardiovascular**

---

Doctorand **Nicoleta Valentina Leach**

---

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Mircea Grigorescu**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>15</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>17</b>
<b>1. Steatohepatita nonalcoolică</b>	<b>19</b>
1.1. Cadrul nosologic. Definiție.	19
1.2. Epidemiologia și istoria naturală a FGNA și a SHNA	19
1.3. Factori de risc pentru apariția steatozei hepatice și a SHNA	20
1.3.1. Vârsta și sexul	20
1.3.2. Factori etnici	20
1.3.3. Agregarea familială	20
1.3.4. Factori de mediu	21
1.3.5. Prezența SM sau a unora dintre componentele sale	21
1.3.6. Modificări ale metabolismului fierului	22
<b>2. Patogeneza steatohepatitei nonalcoolice</b>	<b>23</b>
2.1. Lipotoxicitatea și insulinorezistența	23
2.2. Steatoza hepatică	25
2.3. Inflamația hepatică	25
2.3.1. Stresul oxidativ	26
2.3.1.1. Peroxidarea lipidelor	26
2.3.1.2. Inducerea de citokine și chemokine	26
2.3.1.3. Inducerea apoptozei celulare	27
2.3.2. Disfuncția mitocondrială	27
2.3.3. Disfuncția lizozomală	28
2.3.4. Inflamazomul	28
2.3.5. Endotoxinemia	28
2.3.6. Predispoziția genetică	28
2.4. Fibrogeneza hepatică	28
<b>3. Riscul cardiovascular și steatohepatita nonalcoolică</b>	<b>31</b>
3.1. Evidențe privind asocierea dintre riscul cardiovascular și SHNA	31
3.2. Factorii de risc cardiovasculari și SHNA	32
3.2.1. Factorii de risc cardiovasculari clasici și SHNA	32
3.2.2. Noi factori de risc cardiovasculari și SHNA	33
3.2.2.1. Markerii ai inflamației	33
3.2.2.2. Markerii protrombotici	33
3.3. Metode de evaluare a riscului cardiovascular la pacienții cu SHNA	34
3.3.1. Metode imagistice	34
3.3.1.1. Măsurarea prin ecografie Doppler a GIM	34
3.3.1.2. Vasodilatației mediată de flux	34
3.3.2. Scoruri de risc cardiovascular	34
3.3.2.1. Scorul de risc Framingham	34
3.3.2.2. Scorul calcic coronarian	34
3.4. Mecanisme posibil implicate în apariția BCV la pacienții cu SHNA	35
3.4.1. Țesutul adipos visceral, IR și ATS	35
3.4.2. SHNA și ATS	37
<b>4. Homocisteina</b>	<b>39</b>
4.1. Date generale	39
4.2. Metabolismul homocisteinei	39
4.3. Cauzele hiperhomocisteinemiei	41

4.4. Homocisteina și riscul cardiovascular	42
4.5. Homocisteina și SHNA	42
<b>Contributia personala</b>	<b>43</b>
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	<b>45</b>
<b>2. Metodologie generală</b>	<b>47</b>
2.1. Populația luată în studiu	47
2.2. Evaluarea clinică	48
2.3. Prelevarea și prelucrarea probelor de sânge	49
2.4. Determinări biochimice	49
2.5. Determinări imagistice	49
2.6. Determinări histologice	50
2.7. Analiza statistică	50
<b>3. Studiul 1. Sindromul metabolic și SHNA</b>	<b>53</b>
3.1. Introducere	53
3.2. Obiective	53
3.3. Material și metodă	53
3.4. Rezultate	54
3.4.1. Caracteristicile pacienților	54
3.4.2. Rezistența la insulină și corelațiile cu alte variabile	60
3.4.3. Obezitatea abdominală și corelațiile cu alți factori	60
3.5. Discuții	64
3.6. Concluzii	65
<b>4. Studiul 2 – Homocisteina și stresul oxidativ la pacienții cu SHNA</b>	<b>67</b>
4.1. Introducere	67
4.2. Obiective	67
4.3. Material și metodă	68
4.4. Rezultate	68
4.5. Discuții	81
4.6. Concluzii	84
<b>5. Studiul 3. Nivelul seric al proteinei monocitare chemoattractante, inflamația hepatică și ateroscleroza subclinică la pacienții cu SHNA</b>	<b>85</b>
5.1. Introducere	85
5.2. Obiective	85
5.3. Material și metodă	86
5.4. Rezultate	86
5.5. Discuții	90
5.6. Concluzii	92
<b>6. Studiul 4. Evaluarea riscului cardiovascular prin măsurarea GIM la pacienții cu SHNA</b>	<b>93</b>
6.1. Introducere	93
6.2. Obiective	93
6.3. Material și metode	94
6.4. Rezultate	94
6.5. Discuții	98
6.6. Concluzii	100
<b>7. Concluzii generale (sinteză)</b>	<b>103</b>
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>107</b>
<b>Referințe</b>	<b>109</b>

**Cuvinte cheie:** steatohepatita nonalcoolică, riscul cardiovascular, stresul oxidativ, inflamația hepatică, proteina chemoatractantă monocitară-1, homocisteina, grosimea intimă-medie carotidiană

**Referințe:** 236

## Introducere

Steatohepatita nonalcoolică (SHNA) face parte din spectrul de boli aparținând ficatului gras nonalcoolic (FGNA) și reprezintă o condiție clinică cu caracter progresiv spre ciroza hepatică, insuficiența hepatică și hepatocarcinom. Importanța diagnosticării SHNA nu este datorată numai potențialului evolutiv crescut ci mai ales din cauza morbidității și mortalității cardiovasculare care sunt asociate cu această boală hepatică.

Mortalitatea cardiovasculară reprezintă principala cauză de deces la acești pacienți, urmată de cancer și apoi de boala hepatică *per se*.

Rolul SHNA ca și potențial factor de risc cardiovascular este un nou subiect de dezbatere ținând cont de prevalența crescută a acestei boli hepatice în populația generală. Multe studii au arătat că există o strânsă legătură între FGNA și bolile cardiovasculare și că SHNA prezintă un risc cardiovascular mai mare decât cel conferit de prezența factorilor de risc cardiovascular clasici sau de prezența sindromului metabolic.

Patogeneza SHNA este multifactorială și incomplet elucidată. Insulinorezistența (IR) și stresul oxidativ (SO) reprezintă mecanismele principale implicate atât în apariția SHNA cât și a aterosclerozei (ATS).

SHNA poate juca un rol în patogeneza ATS atât prin eliberarea la nivel sistemic a mai multor tipuri de mediatori implicați în apariția inflamației sistemice, stresului oxidativ, stării de hipercoagulabilitate și hipofibrinoliză cât și prin contribuția bolii hepatice *per se* la dezvoltarea insulinorezistenței și a dislipidemieii aterogene.

Hiperhomocisteinemia este considerată un factor de risc cardiovascular independent. Totodată perturbarea metabolizării homocisteinei (Hcy) prin afectarea căii de transulfurare determină scăderea sintezei de glutation și astfel poate contribui la apariția sau intensificarea SO.

Proteina monocitară chemoatractantă (MCP-1) este o chemokină, produsă în special de macrofage și celulele endoteliale, care are un rol central în recrutarea monocitelor și dediferențierea lor în macrofage în țesutul adipos, ficat și în peretele arterial.

Măsurarea prin ecografie Doppler a grosimii intimă-medie la nivel carotidian (GIM) este o metodă simplă și ieftină recomandată de AHA (*American Heart Association*) pentru evaluarea noninvazivă a riscului cardiovascular. GIM este un predictor independent al evenimentelor cardiovasculare și un marker surogat al ATS subclinice.

Rolul SHNA ca și potențial factor de risc cardiovascular este un nou și foarte important subiect de cercetare astfel încât această teză de doctorat a urmărit pe parcursul a patru studii distincte evaluarea riscului cardiovascular și a unor posibili factori și mecanisme implicate atât în patogeneza SHNA cât și a ATS subclinice.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Metodologie generală

Studiile s-au desfășurat în cadrul Clinicilor Medicala III și IV Cluj-Napoca în perioada martie - iunie 2011.

Populația folosită în cele patru studii a cuprins un număr de 80 de participanți care au fost împărțiți în două loturi după cum urmează:

1. lotul de studiu a fost reprezentat de 50 de pacienți diagnosticați cu SHNA prin examinare morfologică (având un scor NAS  $\geq 3$  și diferite grade de fibroză) anterioară lucrării de față; diagnosticul fiind reconfirmat prin ultrasonografie abdominală și creșterea transaminazelor.

2. lotul de control a fost constituit din 30 de subiecți sănătoși, de sex și vârstă asemănătoare cu pacienții din lotul de studiu.

**Criteriile de includere pentru pacienții din grupul de studiu** au fost următoarele:

- vârsta peste 18 ani;
- PBH care să ateste diagnosticul de SHNA (steatoză predominant macroveziculară, inflamație lobulară și balonizare hepatocitară localizate tipic în zona 3 acinară, însoțite sau nu de diferite grade de fibroză)<sup>3</sup>, cu un scor de activitate NAS  $\geq 3$ .
- prezența steatozei hepatice la ecografia abdominală efectuată în momentul intrării în studiu;
- creșterea transaminazelor (ALAT  $\geq 1,5$  ori peste limita superioară a normalului) în momentul intrării în studiu.

**Criterii de excludere pentru pacienții din grupul de studiu:**

- consumul de alcool  $> 30$  g alcool/zi pentru bărbați și  $> 20$  g/zi pentru femei;
- prezența markerilor serologici pentru hepatita virală B (AgHBs pozitiv), hepatita virală C (anticorpi antiHCV pozitivi), infecția cu virus citomegalic (anticorpi AntiCVM pozitivi) sau cu virus Epstein-Barr (anticorpi antiEBV pozitivi);
- prezența altor boli hepatice (hepatita autoimună, ciroza biliară primitivă, hemocromatoza, boala Wilson, deficitul de  $\alpha 1$ -antitripsină, colangita biliara primitivă, ciroza hepatică, CHC);
- prezența medicației care să cauzeze steatoză hepatică (corticosteroizi, estrogeni, metotrexat, tamoxifen, tetraciclina, blocați de calciu, amiodarona, medicație antituberculoasă) sau să influențeze nivelul seric al Hcy sau stresul oxidativ (vitamina B, C, E acid folic, aspirina sau anticoagulante orale, L-DOPA, acid nicotinic, teofilina);
- prezența bolilor autoimune, IRC sau a neoplaziilor.

**Criterii de includere pentru lotul de control:** vârsta peste 18 ani, ecografie hepatică normală, markeri virali negativi pentru hepatita B și C, teste biochimice hepatice normale.

Toți participanții incluși în studiu au fost evaluați clinic pe baza anamnezei și a examenului fizic detaliat. Informațiile obținute au fost structurate sub forma unui chestionar care a cuprins date personale, demografice, antropometrice; date privind prezența factorilor de risc cardiovasculari (fumat, sedentarism, dieta dezechilibrată, prezența diabetului zaharat, a HTA, a dislipidemieii); date privind consumul de alcool.

Tuturor participanților li s-au efectuat determinări biochimice uzuale (AST, ALT, FA, GGT, trigliceride, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, glicemie), speciale (insulinemie, MCP-1, Hcy, vitamina B6, vitamina B12, acidul folic, glutationul redus și total, MDA, SOD și GPx) și ecografice. Ecografia abdominală s-a efectuat în vederea evaluării prezenței steatozei hepatice, măsurării grosimii țesutului adipos visceral (VFT) și a celui subcutanat (SFT). Ecografia carotidiană Doppler a urmărit măsurarea grosimii intimă-medie carotidiană (GIM) și prezența plăcilor ATS.

Prezența rezistenței la insulină a fost evaluată prin modelul de evaluare a homeostaziei glicemice pentru IR (*Homeostatic model assessment*= HOMA-IR) după formula:  $HOMA-IR = \text{glicemia bazală (mg/dl)} \times \text{insulinemia bazală } (\mu\text{U/ml}) / 405$ .

S-a considerat un index HOMA-IR  $\geq 2$  ca și criteriu de IR și  $\geq 4$  ca și stare prediabetică.

Pentru analiza statistică am folosit programul SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) pentru Windows, versiunea 21.0 (Chicago, Illinois, USA). Corelația dintre două variabile cantitative s-a făcut cu corelația Pearson sau Spearman's rho, în funcție de situație. Am utilizat testul AUROC pentru a determina valoarea prag a unei variabile cantitative, predictivă pentru un anumit eveniment și am calculat sensibilitatea și specificitatea acestei valori prag. Analiza multivariată a constatat în folosirea unei regresii liniare multiple sau regresii logistice binare, în funcție de situație. O valoare a lui  $p < 0,05$  a fost considerată semnificativă statistic.

## Studiul 1. Sindromul metabolic și SHNA

**Introducere:** Prezența SM la pacienții cu SHNA este însoțită atât de creșterea severității afectării hepatice cât și de creșterea riscului cardiovascular. Acest studiu și-a propus evaluarea prezenței SM și a componentelor sale la pacienții cu SHNA.

**Material și metodă:** Au fost incluși în studiu 50 de pacienți cu SHNA și 30 de subiecți martor, respectându-se criteriile de includere și excludere, precum și cele etice menționate mai sus. Diagnosticul de sindrom metabolic a fost stabilit pe baza recomandărilor făcute în cadrul Consensului din anul 2009 care stabilește ca fiind necesare oricare 3 din următoarele criterii (nu mai este impusă prezența obligatorie a obezității abdominale): circumferința abdominală (CA)  $\geq 94$  cm la bărbați și  $\geq 80$  cm la femei; creșterea trigliceridelor  $\geq 150$ mg/dl sau tratament specific pentru această dislipidemie; scăderea HDL-colesterolului  $<40$  g/dl la bărbați și  $<50$  mg/dl la femei sau tratament specific; TAS  $\geq 130$  mmHg/TAD  $\geq 85$  mmHg/ sau tratament antihipertensiv; creșterea glicemiei bazale  $\geq 100$ mg/dl sau DZ tip 2 diagnosticat anterior.

**Rezultate:** Distribuția vârstei și a sexului a fost asemănătoare între cele două loturi de studiu. Vârsta medie a pacienților cu SHNA a fost de  $45,76 \pm 10,9$  ani iar a subiecților din lotul de control de  $44,9 \pm 7,79$  ani. Pacienții de sex masculin au fost majoritari în ambele grupuri reprezentând 70% din grupul de studiu și respectiv 66,7% din lotul de control. Obezitatea a fost prezentă la 27 (54%) dintre pacienții cu SHNA, valorile medii ale IMC fiind de  $31,09 \pm 4,6$  kg/m<sup>2</sup>. Analiza comparativă a pacienților obezi cu SHNA a arătat că femeile au reprezentat 37,03% și au avut o medie a IMC de  $34 \pm 4,2$  kg/m<sup>2</sup> iar bărbații, ce au reprezentat 72,97% , au avut o medie a IMC de  $31 \pm 3,5$  kg/m<sup>2</sup>. IMC a fost corelat semnificativ statistic cu vârsta ( $r=0,364$ ;  $p=0,01$ ), CA ( $r=0,751$ ;  $p<0,001$ ), SFT ( $r=0,321$ ;  $p=0,01$ ) și VFT ( $r=0,463$ ;  $p=0,001$ ). În analiza univariată, factorii asociați semnificativ cu SM la pacienții cu SHNA au fost vârsta mai avansată, HTA, glicemia bazala modificată sau DZ, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, insulinorezistența, creșterea valorilor CA, VFT, LDL-colesterolului și valoarea scăzută a HDL-colesterolului. În analiza multivariată, numai HOMA-IR a fost un factor predictiv independent pentru SM (OR 1,6 95%CI, 1-2,5;  $p=0,04$ ). Prevalența SM în grupul pacienților cu SHNA a fost de 53,1%. În ceea ce privește numărul de componente ale SM, cei mai mulți pacienți cu SHNA au avut 3 componente (34,69%) urmați de cei cu 4 componente (28,57%). Nici un pacient cu SHNA nu a avut toate cele 5 componente ale SM. Cea mai frecvent intalnită trăsătură a SM a fost obezitatea abdominală, urmată de HTA și scăderea HDL-colesterolului. Pacienții cu SHNA au avut valori semnificativ mai mari ale HOMA-IR comparativ cu lotul de control. Prevalența insulinorezistenței evaluată prin HOMA-IR  $\geq 2$  a fost de 69,7% la pacienții cu SHNA vs. 43,3% la subiecții din lotul de control ( $p=0,04$ ). Prevalența IR la pacienții cu SHNA și SM a fost semnificativ statistic mai mare față de pacienții cu SHNA dar fără SM (80,8% vs. 52,9%,  $p=0,01$ ).

În analiza univariată, HOMA-IR s-a corelat pozitiv cu CA ( $r=0,321$ ;  $p=0,03$ ), VFT ( $r=0,400$ ;  $p<0,001$ ), IMC ( $r=0,230$ ;  $p=0,04$ ), AST ( $r=0,444$ ;  $p<0,001$ ), ALT ( $r=0,320$ ;  $p=0,006$ ) și GGT ( $r=0,343$ ;  $p=0,02$ ). Pentru HOMA-IR  $\geq 2$ , analiza prin regresie liniară multiplă a stabilit ca numai VFT ( $p=0,001$ ) a fost singurul factor asociat independent cu IR la acest prag. Pacienții cu SHNA comparativ cu lotul de control au avut o distribuție a obezității de tip abdominal dovedită de creșterea semnificativă a CA, VFT, și a raportului T/S  $>1$ . Creșterea CA a fost asociată semnificativ statistic cu creșterea IMC ( $r=0,751$ ;  $p<0,001$ ). Totodată au existat corelații pozitive între CA și VFT ( $r=0,442$ ,  $p<0,001$ ), insulinemie ( $r=0,405$ ;  $p=0,007$ ) și HOMA-IR ( $r=0,321$ ;  $p=0,03$ ). În analiza univariată, VFT s-a corelat pozitiv cu IMC, CA, colesterolul total, LDL-colesterolul, trigliceridele, insulinorezistența, AST, ALT, GGT și negativ cu HDL-colesterolul. Pacienții cu HTA au avut VFT mai mare ( $92,8 \pm 19,6$ )mm decât cei fără HTA ( $64,2 \pm 24,5$ )mm ( $p<0,001$ ). Pacienții cu DZ au avut VFT mai mare ( $106,8 \pm 11,4$ )mm decât cei fără DZ ( $71 \pm 25,7$ ) mm ( $p<0,001$ ). Pacienții cu HOMA-IR  $\geq 2$  au avut VFT mai mare ( $80,3 \pm 26,8$ )mm decât cei cu HOMA-IR  $<2$  ( $60,5 \pm 20,6$ )mm ( $p=0,001$ ). În analiza multivariată, singurul factor asociat independent cu VFT a fost IMC ( $p=0,03$ ). Aria de sub curba (AUC) pentru VFT ca și predictor al prezenței SHNA la femei a fost 0,960 (CI 95% 0,886-1,  $p<0,001$ ) iar valoarea cut-off  $>54,3$  mm a avut sensibilitate 93,3% (CI 95% 55,5-99,7) și specificitate 90% (CI 95% 55,5-99,7). La bărbați, aria de sub curba (AUC) pentru VFT ca și

predictor al prezenței SHNA a fost 0,900 (CI 95% 0,822-0,978,  $p < 0,001$ ) iar valoarea cut-off  $> 70$  mm a avut sensibilitate 70,5% (CI 95% 52,5-84,9) și specificitate 100% (CI 95% 83,2-100).

## Studiul 2. Homocisteina și stresul oxidativ la pacienții cu SHNA

**Introducere:** Acest studiu a avut ca obiective: determinarea nivelului seric al homocisteinei la pacienții cu SHNA; determinarea nivelului vitaminelor B6, B12 și a acidului folic; stabilirea corelațiilor dintre nivelul seric al Hcy și al vitaminelor implicate în metabolismul său; evaluarea asocierii dintre Hcy și parametrii clinici, biochimici, profilul lipidic, nivelul insulinei și insulinorezistența; evaluarea markerilor stresului oxidativ și investigarea relației acestora cu parametrii clinici și biochimici; evaluarea asocierii dintre nivelul seric al Hcy și markerii stresului oxidativ.

**Material și metodă:** Au fost incluși în studiu 50 de pacienți cu SHNA și 30 de subiecți martor, respectându-se criteriile de includere și excludere, precum și cele etice menționate mai sus. Nivelele serice ale homocisteinei, vitaminei B6 și MDA s-au determinat prin cromatografie lichida de înaltă performanță în fază inversă (RP-HPLC). Glutacionul total (GSH+GSSG), redus (GSH) și oxidat (GSSG) s-au determinat din sânge integral (recoltat pe EDTA) prin HPLC. Nivelele serice ale vitaminei B12 și ale folatului au fost măsurate printr-o metodă imunenzimatică (ELISA). Activitățile SOD eritrocitare și GPx din sânge integral au fost determinate prin metode colorimetrice pe un analizor Cobas Mira Plus.

**Rezultate:** Nivelul seric al Hcy a fost semnificativ mai mare ( $p = 0,001$ ) la pacienții cu SHNA comparativ cu lotul de control, dar nu au existat diferențe semnificative statistic între nivelele serice ale vitaminelor B6, B12 și ale acidului folic între cele două loturi de studiu. Sedentarismul și hipertensiunea au fost asociate semnificativ cu valori mai mari ale homocisteinei. Nivelul seric al homocisteinei s-a corelat pozitiv cu IMC ( $r = 0,257$ ,  $p = 0,02$ ), circumferința abdominală ( $r = 0,337$ ,  $p = 0,004$ ), raportul T/S ( $r = 0,340$ ,  $p = 0,003$ ), colesterolul total ( $r = 0,301$ ,  $p = 0,03$ ), LDL-colesterolul ( $r = 0,268$ ,  $p = 0,02$ ), trigliceride ( $r = 0,301$ ,  $p = 0,01$ ), AST ( $r = 0,380$ ,  $p = 0,01$ ), ALT ( $r = 0,291$ ,  $p = 0,01$ ) și negativ cu GGT ( $r = -0,296$ ,  $p = 0,01$ ). Pacienții cu SHNA au prezentat creșterea stresului oxidativ dovedită de scăderea semnificativă statistic ale nivelelor serice ale glutacionului redus (GSH), glutacionului total (GSH+GSSG), a raportului GSH/GSSG și ale activității GPx și de creșterea semnificativă statistic a nivelului de MDA, comparativ cu lotul de control. La analiza relației dintre nivelul seric al Hcy și markerii stresului oxidativ am evidențiat o serie de corelații semnificative statistic. Nivelul seric al Hcy s-a corelat negativ cu activitatea SOD ( $r = -0,281$ ;  $p = 0,01$ ), glutacionul redus și total ( $r = -0,325$ ,  $p = 0,009$  respectiv  $r = -0,355$ ,  $p = 0,03$ ), raportul GSH/GSSG ( $r = -0,341$ ;  $p = 0,03$ ). Nu au existat corelații între Hcy și nivelul seric al MDA ( $r = -0,165$ ;  $p = 0,1$ ) sau al activității GPx ( $r = 0,247$ ;  $p = 0,06$ ). În analiza multivariată, SHNA a fost semnificativ asociată cu nivelul crescut al Hcy ( $\beta$  coeficient 0,302,  $p = 0,05$ ), independent de vârstă ( $p = 0,6$ ), sex ( $p = 0,1$ ), fumat ( $p = 0,07$ ), dieta dezechilibrată ( $p = 0,9$ ), sedentarism ( $p = 0,6$ ), HTA ( $p = 0,4$ ) și IMC ( $p = 0,7$ ).

## Studiul 3. Nivelul seric al proteinei monocitare chemoattractante, inflamația hepatică și ateroscleroza subclinică la pacienții cu SHNA

**Introducere:** Sunt foarte puține studii care au evaluat nivelul seric al MCP-1 la pacienții cu FGNA dar nici unul care să studieze legătura dintre MCP-1 și ateroscleroza subclinică la pacienții cu SHNA. Obiectivele acestui studiu au fost: determinarea nivelului seric al MCP-1 la pacienții cu SHNA; evaluarea asocierii dintre MCP-1 și parametrii biochimici, profilul lipidic, nivelul insulinei și insulinorezistența; evaluarea asocierii dintre MCP-1 și factorii de risc cardiovasculari; stabilirea corelațiilor dintre nivelul seric al MCP-1 și VFT; stabilirea corelațiilor dintre nivelul seric al MCP-1 și GIM.

**Material și metodă:** Au fost incluși în studiu 50 de pacienți cu SHNA și 30 de subiecți martor, respectându-se criteriile de includere și excludere, precum și cele etice menționate mai sus. Nivelul seric al MCP-1 a fost măsurat printr-o metoda imunenzimatică (ELISA).

**Rezultate:** Nivelul seric al MCP-1 a fost semnificativ statistic mai mare la pacienții cu SHNA comparativ cu lotul de control și a fost cu atât mai mare cu cât nivelele serice ale AST și ALT au fost mai mari. Dintre factorii de risc cardiovasculari clasici (vârstă, sex, fumat, sedentarism, dislipidemie, HTA, DZ) numai HTA, obezitatea și dislipidemia s-au asociat semnificativ statistic cu creșterea nivelului seric al MCP-1. Nivelul seric al MCP-1 a fost corelat pozitiv cu colesterolul total, LDL-colesterolul, trigliceridele, HOMA-IR, VFT, CA, IMC și negativ cu HDL-colesterolul. În analiza univariată, pacienții care au avut o GIM crescută au avut nivele semnificativ statistic mai mari ale MCP-1 (554,4 (321; 893,3)pg/ml comparativ cu pacienți cu GIM normală (313,1 (276,4; 399,2)pg/ml. Analiza multivariată a arătat că SHNA și HOMA-IR au fost independent asociate cu creșterea nivelului seric al MCP-1 (coeficient  $\beta$  0,180;  $p=0,003$ ; respectiv coeficient  $\beta$  0,049;  $p=0,002$ ), aceasta asociere fiind independentă de creșterea GIM.

#### **Studiul 4. Evaluarea riscului cardiovascular prin măsurarea GIM la pacienții cu SHNA**

**Introducere:** Obiectivele acestui studiu au fost de a evalua: prezența riscului cardiovascular prin măsurarea prin ecografie Doppler a GIM la cele două loturi de studiu; prezența plăcilor ATS și a asocierilor acestora cu factorii de risc cardiovasculari, parametrii biochimici, profilul lipidic, nivelul insulinei și insulinorezistența la cele două loturi de studiu; asocierile dintre GIM și factorii de risc cardiovasculari atât clasici cât și noi (Hcy), parametrii biochimici, nivelul insulinei și insulinorezistența la cele două loturi de studiu; asocierile dintre GIM și markerii stresului oxidativ.

**Material și metodă:** Tipul studiului, populația și metodele folosite au fost descrise în capitolul de metodologie generală. Determinarea Hcy și a parametrilor stresului oxidativ au fost descrise în studiul 2.

**Rezultate:** Pacienții cu SHNA au avut o GIM crescută semnificativ statistic față de lotul de control (0,9 mm vs. 0,6 mm). Numai pacienții cu SHNA au prezentat plăci aterosclerotice. Prevalența plăcilor ATS la pacienții cu SHNA a fost de 14,2%. Studiind prevalența plăcilor ATS, am observat că aceasta a fost influențată de vârstă, de prezența insulinorezistenței, HTA și a obezității. Analiza factorilor de risc cardiovasculari tradiționali a evidențiat că numai HTA, sedentarismul, obezitatea și dislipidemia au fost mai frecvente la pacienții cu SHNA decât în grupul de control. În analiza univariată, factorii de risc cardiovasculari clasici asociați cu creșterea GIM au fost vârsta mai avansată, fumatul, sedentarismul, insulinorezistența, hipercolesterolemia, HTA, dieta dezechilibrată, hipertrigliceridemia, creșterea CA, a VFT, a LDL-colesterolului și scăderea HDL-colesterolului. Prezența SM s-a asociat cu creșterea semnificativă a GIM. Dintre factorii cardiovasculari noi, Hcy nu s-a asociat semnificativ statistic cu GIM deși pacienții cu SHNA au avut nivel seric al Hcy crescut semnificativ statistic vs. lotul de control. Creșterea GIM s-a corelat pozitiv cu creșterea AST ( $r=0,377$ ;  $p=0,01$ ) și ALT ( $r=0,263$ ;  $p=0,01$ ). În analiza univariată, creșterea GIM a fost asociată semnificativ cu scăderea nivelului seric al glutatationului redus, total, al raportului GSH/GSSG și al activității GPx. În analiza multivariată, după ajustarea factorilor de risc cardiovasculari (vârstă, sex, fumat, IMC, SM), SHNA a fost independent asociată cu creșterea GIM (OR 13,9, 95% CI, 1,9 la 99,  $p<0,001$ ). Alți factori asociați independent cu creșterea GIM au fost indicele de rezistență la insulină HOMA-IR ( $p=0,006$ ) și vârsta ( $p=0,001$ ).

#### **Concluzii generale:**

1. Prevalența SM și a IR au fost crescute la pacienții cu SHNA;
2. Mai mult de jumătate dintre pacienții cu SHNA au avut cel puțin 3 trăsături ale SM;
3. Obezitatea abdominală, HTA și scăderea HDL-colesterolului au fost cele mai frecvente componente ale SM la pacienții cu SHNA;
4. Singurul factor independent asociat cu prezența SM a fost IR;
5. Rezistența la insulină, evaluată prin indicele HOMA-IR, s-a corelat pozitiv cu obezitatea abdominală și creșterea transaminazelor;
6. VFT a fost singurul factor independent asociat cu IR;



7. Creșterea IMC a fost singurul factor asociat independent cu creșterea VFT;
8. Obezitatea abdominală a fost asociată cu creșterea IR, a transaminazelor și cu perturbarea metabolismului lipidic;
9. Măsurarea ecografică a țesutului adipos visceral (VFT) se dovedește a fi un foarte bun predictor independent al SHNA și o metoda ecografică simplă și neinvazivă de evaluare a obezității abdominale;
10. Pacienții cu SHNA prezintă un nivel seric crescut al Hcy față de lotul de control, independent de vârstă, sex, prezența fumatului, a dietei dezechilibrate, a DZ, IR, concentrațiile serice ale vitaminelor B6, B12 și ale folatului;
11. Nivelul crescut al Hcy se corelează cu sedentarismul, HTA, obezitatea, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia și creșterea LDL-colesterolului;
12. HHcy ușoară este probabil cauzată de afectarea căii de transulfurare a Hcy ca efect al alterării metabolismului hepatic din cadrul SHNA;
13. Pacienții cu SHNA prezintă o creștere a stresului oxidativ comparativ cu lotul de control, fapt dovedit de reducerea nivelului glutationului redus și total, a raportului GSH/GSSG, a activității GPx precum și de creșterea nivelului produsului de peroxidare lipidică –MDA;
14. Scăderea glutationului redus și total a fost asociată cu creșterea indicelui HOMA-IR, ceea ce poate reflecta strânsa asociere și interdependență între IR și SO, cele două mecanisme principale implicate în patogeneza SHNA;
15. Scăderea GSH și a raportului GSH/GSSG s-a asociat cu sedentarismul, obezitatea, HTA, hipertrigliceridemia, hipo HDL-colesterolemia și creșterea transaminazelor (ceea ce indică contribuția SO la apariția necro-inflamației hepatice);
16. Nivelul seric al Hcy s-a corelat negativ cu glutationul redus și total, raportul GSH/GSSG și activitatea SOD ceea ce dovedește că HHcy contribuie la accentuarea SO la pacienții cu SHNA;
17. SHNA a fost asociată independent atât cu creșterea nivelului seric al Hcy cât și cu scăderea GSH;
18. Anomaliile metabolice prezente la pacienții cu SHNA (obezitatea, dislipidemia, insulinorezistența) sunt asociate cu scăderea nivelului antioxidanților.
19. Determinarea nivelului seric al Hcy ar putea fi utilă atât ca marker al disfuncției hepatice cât și ca indicator al creșterii stresului oxidativ la pacienții cu SHNA.
20. Pacienții cu SHNA prezintă un nivel seric crescut al MCP-1 care este datorat obezității abdominale, IR și inflamației hepatice;
21. IR, inflamația hepatică și MCP-1 se intercondiționează reciproc;
22. Ficatul reprezintă atât o sursă cât și o țintă a unor factori pro-inflamatori cum este MCP-1;
23. Determinarea nivelului seric al MCP-1 poate fi folosită ca și marker al inflamației hepatice;
24. Dintre factorii de risc cardiovasculari numai HTA, obezitatea și dislipidemia s-au asociat semnificativ statistic cu creșterea nivelului seric al MCP-1;
25. Deși nivelul seric al MCP-1 s-a asociat pozitiv cu creșterea GIM, MCP-1 nu poate fi folosit ca un marker al riscului cardiovascular la pacienții cu SHNA;
26. Găsirea unor agenți farmacologici care să blocheze receptorul MCP-1 ar putea reprezenta o nouă strategie terapeutică la pacienții cu SHNA.
27. Factorii de risc cardiovasculari asociați cu SHNA au fost: HTA, obezitatea, dislipidemia și sedentarismul;
28. SHNA este un factor de risc cardiovascular independent;
29. Riscul cardiovascular crescut în SHNA este dovedit de creșterea GIM;
30. Numai pacienții cu SHNA au prezentat plăci aterosclerotice. Prevalența plăcilor ATS la pacienții cu SHNA a fost de 14,2% și a fost asociată cu vârsta mai avansată, insulinorezistența, HTA și obezitatea;

31. Creșterea GIM a fost asociată cu următorii factori de risc cardiovascular: vârsta, fumatul, HTA, obezitatea abdominală, SM, hipercolesterolemia, creșterea LDL-colesterolului, hipertrigliceridemia și scăderea HDL-colesterolului;
32. Creșterea GIM a fost asociată cu necro-inflamația hepatică care poate reprezenta una dintre legăturile dintre SHNA și ATS subclinică;
33. Factorii asociați independent cu creșterea RCV evaluat prin măsurarea ecografică a GIM au fost vârsta, insulinorezistența și prezența SHNA;
34. Hcy nu poate fi considerată un nou factor de risc cardiovascular la pacienții cu SHNA;
35. Măsurarea prin ecografie Doppler a grosimii intimă-medie carotidiană (GIM) este o metodă simplă și neinvazivă de evaluare a riscului cardiovascular la pacienții cu SHNA;
36. Evaluarea precoce a RCV la pacienții cu SHNA este importantă deoarece BCV reprezintă principala cauză de morbiditate și mortalitate la acești pacienți.

PhD Thesis abstract

# **Nonalcoholic steatohepatitis. Patogenetic aspects and cardiovascular risk**

Doctoral candidate: **Nicoleta Valentina Leach**

Mentor: **Prof. Mircea Grigorescu, MD, PhD**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>17</b>
<b>1. Nonalcoholic steatohepatitis</b>	<b>19</b>
1.1. Nosologic status. Definition.	19
1.2. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH	19
1.3. Risk factors for the development of steatosis and NASH	20
1.3.1. Age and gender	20
1.3.2. Ethnic factors	20
1.3.3. Familial aggregation	20
1.3.4. Environmental factors	21
1.3.5. The presence of MS or some of its components	21
1.3.6. Changes in iron metabolism	22
<b>2. Pathogenesis of NASH</b>	<b>23</b>
2.1. Lipotoxicity and insulin resistance	23
2.2. Hepatic steatosis	25
2.3. Liver inflammation	25
2.3.1. Oxidative stress	26
2.3.1.1. Lipid peroxidation	26
2.3.1.2. Induction of cytokines and chemokines	26
2.3.1.3. Induction of apoptosis	27
2.3.2. Mitochondrial dysfunction	27
2.3.3. Lysosomal dysfunction	28
2.3.4. Inflammasome	28
2.3.5. Endotoxemia	28
2.3.6. Genetic predisposition	28
2.4. Hepatic fibrogenesis	28
<b>3. The cardiovascular risk and nonalcoholic steatohepatitis</b>	<b>31</b>
3.1. Evidence of an association between the cardiovascular risk and NASH	31
3.2. Cardiovascular risk factors and NASH	32
3.2.1. Conventional cardiovascular risk factors and NASH	32
3.2.2. New cardiovascular risk factors and NASH	33
3.2.2.1. Inflammatory markers	33
3.2.2.2. Prothrombotic markers	33
3.3. Methods for assessing the risk of cardiovascular events in patients with NASH	34
3.3.1. Imaging techniques	34
3.3.1.1. Doppler ultrasound measurement of IMT	34
3.3.1.2. Flow-mediated vasodilatation	34
3.3.2. Cardiovascular Risk Scores	34
3.3.2.1. The Framingham risk score	34
3.3.2.2. Coronary calcium score	34
3.4. Possible mechanisms involved in the development of CVD in patients with NASH	35
3.4.1. Visceral adipose tissue, IR and ATS	35
3.4.2. NASH and ATS	37
<b>4. Homocysteine</b>	<b>39</b>
4.1. General Information	39
4.2. Homocysteine metabolism	39
4.3. Hyperhomocysteinemia	41
4.4. Homocysteine and cardiovascular risk	42

4.5. Homocysteine and NASH	42
<b>Personal contribution</b>	<b>43</b>
<b>1. Working hypothesis</b>	<b>45</b>
<b>2. General methodology</b>	<b>47</b>
2.1. Patients	47
2.2. Clinical assessment	48
2.3. Blood collection and processing	49
2.4. Biochemical determination	49
2.5. Imaging assessment	49
2.6. Histological determination	50
2.7. Statistical analysis	50
<b>3. Study 1. Metabolic syndrome and NASH</b>	<b>53</b>
3.1. Introduction	53
3.2. Objectives	53
3.3. Material and methods	53
3.4. Results	54
3.4.1. Patient characteristics	54
3.4.2. Insulin resistance and correlations with other variables	60
3.4.3. Abdominal obesity and correlations with other factors	60
3.5. Discussions	64
3.6. Conclusions	65
<b>4. Study 2 – Homocysteine and oxidative stress in patients with NASH</b>	<b>67</b>
4.1. Introduction	67
4.2. Objectives	67
4.3. Material and methods	68
4.4. Results	68
4.5. Discussions	81
4.6. Conclusions	84
<b>5. Study 3. Serum monocyte chemoattractant protein-1 levels, liver inflammation and subclinical atherosclerosis in patients with NASH</b>	<b>85</b>
5.1. Introduction	85
5.2. Objectives	85
5.3. Material and methods	86
5.4. Results	86
5.5. Discussions	90
5.6. Conclusions	92
<b>6. Study 4. Assessment of cardiovascular risk by measuring IMT in patients with NASH</b>	<b>93</b>
6.1. Introduction	93
6.2. Objectives	93
6.3. Material and methods	94
6.4. Results	94
6.5. Discussions	98
6.6. Conclusions	100
<b>7. General conclusions (synthesis)</b>	<b>103</b>
<b>8. Originality and innovative contribution</b>	<b>107</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>109</b>

**Key words:** steatohepatita nonalcoolică, riscul cardiovascular, stresul oxidativ, inflamația hepatică, proteina chemoatractantă monocitară-1, homocisteina, grosimea intimă-medie carotidiană

**Referințe: 236**

## **Introduction**

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is part of the wide spectrum of conditions associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and it is a clinical condition that can progress to cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma. The importance of diagnosing NASH is not only due to the increased evolutionary pathway, but mostly to cardiovascular morbidity and mortality associated with this liver disease.

Cardiovascular mortality is the leading cause of death in these patients, followed by cancer and the liver disease *per se*.

The role of NASH as a potential cardiovascular risk factor is a new topic for debate considering the high prevalence of this liver disease in the general population. Many studies have shown that there is a close connection between NAFLD and cardiovascular diseases and that NASH has a greater risk of cardiovascular events than the presence of conventional cardiovascular risk factors or the presence of metabolic syndrome.

The pathogenesis of NASH is multifactorial and incompletely elucidated. Insulin resistance (IR) and oxidative stress (OS) are the main mechanisms involved in the occurrence of both NASH and atherosclerosis (ATS).

NASH may play a role in the pathogenesis of ATS through the systemic release of several types of mediators involved in the occurrence of systemic inflammation, oxidative stress, hypercoagulable states and hypofibrinolysis, as well as through the contribution of the liver disease *per se* in the development of insulin resistance and atherogenic dyslipidemia.

Hyperhomocysteinemia is considered to be an independent cardiovascular risk factor. Moreover, the disturbance of homocysteine (Hcy) metabolism by affecting the transsulfuration pathway leads to the decreases in glutathione synthesis and thus may contribute to the occurrence or intensification of OS.

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a chemokine mainly produced by macrophages and endothelial cells, with a central role in the recruitment of monocytes and their differentiation into macrophages infiltrated in adipose tissue, liver and arterial wall.

Doppler ultrasound measurement of intima-media thickness of the carotid (c-IMT) is a simple and cheap method recommended by the American Heart Association (AHA) for noninvasive assessment of cardiovascular risk. c-IMT is an independent predictor of cardiovascular events and a surrogate marker of subclinical ATS.

The role of NASH as potential cardiovascular risk factor is a new and very important research topic and this thesis has assessed the risk of cardiovascular events and some possible factors and mechanisms involved in the pathogenesis of both NASH and subclinical ATS in four separate studies.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **General methodology**

The studies were conducted within the 3rd and 4th Medical Clinic in Cluj-Napoca, between March 2011 and June 2011.

The four studies included consisted of a total number of 80 participants who were divided into two groups, as follows:

1. The study group was represented by 50 patients diagnosed with NASH by morphological examination (with a  $\geq 3$  NAS score and various degrees of fibrosis) prior to the

present work; the diagnosis was confirmed by abdominal ultrasonography and the elevated amino transferases.

2. The control group consisted of 30 healthy subjects of similar age and gender with the patients in the study group.

The **inclusion criteria for the study group** were as follows:

- over 18 years of age;
- PBH confirming the diagnosis of NASH (predominantly macrovesicular steatosis, lobular inflammation and hepatocyte ballooning typically localized in acinar zone 3, with or without varying degrees of fibrosis)<sup>3</sup>, with a  $\geq 3$  NAS activity score.
- the presence of steatosis observed on abdominal ultrasound performed upon entry into the study;
- elevated amino transferases ( $ALT \geq 1.5$  times the upper normal limit) upon entry into the study.

The **exclusion criteria for the study group** were as follows:

- $\geq 30$  g alcohol consumption/day for men and  $\geq 20$  g/day for women;
- the presence of serological markers of hepatitis B (positive HBsAg), hepatitis C (positive antiHCV antibodies), infection with cytomegalovirus (positive AntiCVM antibodies) or Epstein-Barr virus (positive antiEBV antibodies);
- the presence of other liver diseases (autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, hemochromatosis, Wilson disease,  $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency, biliary cholangitis, cirrhosis, HCC);
- the presence of medication causing hepatic steatosis (corticosteroids, estrogens, methotrexate, tamoxifen, tetracycline, calcium blockers, amiodarone, anti-tuberculosis medication) or influencing serum levels of Hcy and oxidative stress (vitamin B, C, E, folic acid, aspirin or oral anticoagulants, L-DOPA, nicotinic acid, theophylline);
- the presence of autoimmune diseases, CRF or malignancies.

The **inclusion criteria for the control group**: over 18 years of age, normal hepatic ultrasound anatomy, negative viral markers of hepatitis B and C, normal liver biochemical tests.

All participants in the study were clinically assessed based on history and detailed physical examination. The information obtained was structured as a questionnaire that included personal data, demographic and anthropometric data, data on the presence of cardiovascular risk factors (smoking, sedentary lifestyle, unbalanced diet, the presence of diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia), as well as information regarding alcohol consumption.

Conventional biochemical determination (AST, ALT, AP, GGT, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, glucose), special biochemical determination (serum insulin antibodies, serum MCP-1, Hcy, vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub>, whole blood folic acid, whole blood levels of total (GSH+GSSG) and reduced (GSH) glutathione, serum malondialdehyde (MDA), erythrocyte superoxide dismutase (SOD) and whole blood glutathione peroxidase (GPx) activities and ultrasound were performed in all participants. Abdominal ultrasound was performed to assess the presence of steatosis and to measure visceral fat thickness (VFT) and subcutaneous fat thickness (SFT). Carotid Doppler ultrasound aimed to measure carotid intima-media thickness (IMT) and to detect the presence of ATS plaque.

The presence of insulin resistance was assessed using the homeostasis assessment model for insulin resistance (HOMA-IR) using the formula:  $HOMA-IR = \text{fasting plasma glucose (mg/dl)} \times \text{fasting serum insulin } (\mu\text{U/ml}) / 405$ . The cut offs of  $\geq 2$  and  $\geq 4$  were chosen as criteria for IR and prediabetes, respectively.

Statistical analysis was performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows, version 21.0 (Chicago, Illinois, USA). The correlation between two quantitative variables was performed using Pearson's correlation or Spearman's rho correlation, depending on the situation. The AUROC test was used to determine the threshold value of a quantitative variable, predictive of a particular event, calculating the sensitivity and specificity of this threshold value. Multivariate analysis was performed using multiple linear regression or binary logistic regression, depending on the situation. A p value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## Study 1. Metabolic syndrome and NASH

**Introduction:** The presence of MS in patients with NASH is accompanied by increased severity of liver damage and increased risk of cardiovascular events. This study aimed to assess the presence of MS and of its components in patients with NASH.

**Material and methods:** The study included 50 patients with NASH and 30 control subjects, fulfilling the inclusion and exclusion criteria, as well as the ethical criteria mentioned above. The diagnosis of metabolic syndrome was based on the recommendations of the Consensus of 2009 which establishes as necessary three of the following criteria (the presence of abdominal obesity is not imposed as compulsory anymore): waist circumference (WC)  $\geq 94$  cm in men and  $\geq 80$  cm in women; triglycerides (TG)  $\geq 150$ mg/dl or treatment with fibrates; HDL- cholesterol  $\leq 40$  g/dL in men and  $\leq 50$  mg/dl in women or cholesterol-lowering treatment; blood pressure (BP)  $\geq 130/85$  mmHg or antihypertensive treatment; fasting glucose  $\geq 100$  mg/dl or previously diagnosed type 2 diabetes mellitus (DM).

**Results:** Age and gender distribution was similar in the two study groups. Mean age of patients with NASH was  $45.76 \pm 10.9$  years and  $44.9 \pm 7.79$  years for the subjects in the control group. Male patients were the majority in both groups, accounting for 70% of the study group and 66.7% of the control group.

Obesity was present in 27 (54%) of patients with NASH, the average BMI was  $31.09 \pm 4.6$  kg/m<sup>2</sup>. Comparative analysis of obese patients with NASH showed that women accounted for 37.03% of all the patients, with an average BMI of  $34 \pm 4.2$  kg/m<sup>2</sup>, while men, which accounted for 72.97% of all the patients, had an average BMI of  $31 \pm 3.5$  kg/m<sup>2</sup>. There was a statistically significant correlation between BMI and age ( $r=0.364$ ;  $p=0.01$ ), CA ( $r=0.751$ ;  $p<0.001$ ), SFT ( $r=0.321$ ;  $p=0.01$ ) and VFT ( $r=0.463$ ;  $p=0.001$ ). Univariate analysis showed that the factors significantly associated with MS in patients with NASH were old age, hypertension, impaired fasting glucose or diabetes mellitus, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, insulin resistance, higher CA levels, VFT, LDL-cholesterol and low HDL-cholesterol levels. Multivariate analysis showed that only HOMA-IR was an independent predictive factor of MS (OR 1.6 95%CI, 1-2.5;  $p=0.04$ ). The prevalence of MS in the group of patients with NASH was of 53.1%. In terms of the number of components of MS, most patients with NASH had three components (34.69%), followed by 4 components (28.57%). No patient with NASH had all the 5 components of MS. The most common feature of MS was abdominal obesity, followed by hypertension and lower HDL cholesterol levels. Patients with NASH had significantly higher HOMA-IR levels than the control group. The prevalence of insulin resistance assessed using HOMA-IR  $\geq 2$  was of 69.7% in patients with NASH vs.43.3% in subjects in the control group ( $p=0.04$ ). The prevalence of IR in patients with NASH and MS was statistically significantly higher than in patients with NASH but without MS (80.8% vs. 52.9%,  $p=0.01$ ).

Univariate analysis showed that HOMA-IR was positively correlated with CA ( $r=0.321$ ;  $p=0.03$ ), VFT ( $r=0.400$ ;  $p<0.001$ ), BMI ( $r=0.230$ ;  $p=0.04$ ), AST ( $r=0.444$ ;  $p<0.001$ ), ALT ( $r=0.320$ ;  $p=0.006$ ), and GGT ( $r=0.343$ ;  $p=0.02$ ). For HOMA-IR  $\geq 2$ , multiple linear regression analysis determined that VFT ( $p=0.001$ ) was the only factor independently associated with IR at this threshold value. Patients with NASH, compared to the control group, had an abdominal distribution of obesity evidenced by the significant increase in CA, VFT, and by the T/S ratio  $>1$ . The increase in CA levels was statistically significantly associated with higher BMI ( $r=0.751$ ;  $p<0.001$ ). Moreover, there were positive correlations between CA and VFT ( $r=0.442$ ,  $p<0.001$ ), serum insulin levels ( $r=0.405$ ;  $p=0.007$ ) and HOMA-IR ( $r=0.321$ ;  $p=0.03$ ). Univariate analysis showed that VFT was positively associated with BMI, CA, total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, insulin resistance, AST, ALT, GGT and negatively associated with HDL cholesterol. Patients with hypertension had more elevated VFT levels ( $92.8 \pm 19.6$ ) mm than those without hypertension ( $64.2 \pm 24.5$ ) mm ( $p<0.001$ ). Patients with DM had more elevated VFT levels ( $106.8 \pm 11.4$ ) mm than those without DM ( $71 \pm 25.7$ ) mm ( $p<0.001$ ). Patients with HOMA-IR  $\geq 2$  had more elevated VFT levels ( $80.3 \pm 26.8$ ) mm than those with HOMA-IR  $<2$  ( $60.5 \pm 20.6$ ) mm ( $p=0.001$ ). Multiple linear regression analysis showed that the only factor independently associated with VFT was BMI ( $p=0.03$ ). The



area under the curve (AUC) for VFT as a predictor of the presence of NASH in women was 0.960 (CI 95% 0.886-1,  $p < 0.001$ ) and the  $> 54.3$  mm cut-off value had 93.3% sensitivity (CI 95% 55.5-99.7) and 90% specificity (CI 95% 55.5-99.7). In men, the area under the curve (AUC) for VFT as a predictor of the presence of NASH was 0.900 (CI 95% 0.822-0.978,  $p < 0.001$ ) and the  $> 70$  mm cut-off value had 70.5% sensitivity (CI 95% 52.5-84.9) and 100% specificity (CI 95% 83.2-100).

## Study 2. Homocysteine and oxidativ stress in patients with NASH

**Introduction:** This study had the following objectives: to determine serum levels of homocysteine in patients with NASH; to determine the serum level of B6, B12 vitamins and folic acid; to establish correlations between serum Hcy levels and the vitamins involved in its metabolism; to assess the association between Hcy and clinical and biochemical parameters, lipid profile, insulin levels and insulin resistance; to assess oxidative stress markers and to investigate their relationship with clinical and biochemical parameters; to assess the association between serum Hcy levels and oxidative stress markers.

**Material and methods:** The study consisted of 50 patients with NASH and 30 control subjects fulfilling the inclusion and exclusion criteria and the ethical criteria mentioned above. Serum Hcy, vitamin B6 and MDA levels were determined using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

Total glutathione (GSH+GSSG), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were determined in whole blood samples (EDTA) using by HPLC. Serum levels of vitamin B12 and whole blood folic acid were measured using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Determination of erythrocyte SOD and GPx activities in whole blood was done using colorimetric methods employing a Cobas Mira Plus analyzer.

**Results:** Serum Hcy levels were significantly higher ( $p = 0.001$ ) in patients with NASH vs. control group, but there were no statistically significant differences between serum levels of vitamin B6, B12 and folic acid between the two study groups. Physical inactivity and hypertension were significantly associated with higher homocysteine levels. There was a positive correlation between serum Hcy levels and BMI ( $r = 0.257$ ,  $p = 0.02$ ), waist circumference ( $r = 0.337$ ,  $p = 0.004$ ), WHR ( $r = 0.340$ ,  $p = 0.003$ ), total cholesterol ( $r = 0.301$ ,  $p = 0.03$ ), LDL- cholesterol ( $r = 0.268$ ,  $p = 0.02$ ), triglycerides ( $r = 0.301$ ,  $p = 0.01$ ), AST ( $r = 0.380$ ,  $p = 0.01$ ), and ALT ( $r = 0.291$ ,  $p = 0.01$ ). There was a negative correlation between serum Hcy levels and GGT ( $r = -0.296$ ,  $p = 0.01$ ). Patients with NASH showed enhanced oxidative stress as evidenced by the statistically significant decrease in serum levels of reduced glutathione (GSH), total glutathione (GSH+GSSG), GSH/GSSG ratio and GPx activity and by the statistically significant increase in MDA levels, compared to the group of control. The analysis of the relationship between serum levels of Hcy and oxidative stress markers has revealed a number of statistically significant correlations. There was a negative correlation between serum Hcy levels and SOD activity ( $r = -0.281$ ;  $p = 0.01$ ), reduced glutathione and total glutathione ( $r = -0.325$ ,  $p = 0.009$ ; respectively  $r = -0.355$ ,  $p = 0.03$ ) and the GSH /GSSG ratio ( $r = -0.341$ ;  $p = 0.03$ ). There were no correlations between Hcy and serum MDA levels ( $r = -0.165$ ;  $p = 0.1$ ) or GPx activity ( $r = 0.247$ ;  $p = 0.06$ ). Multiple linear regression analysis showed that NASH was significantly associated with higher levels of serum Hcy ( $\beta$  coefficient 0.302,  $p = 0.05$ ), this relation being independent of age ( $p = 0.6$ ), gender ( $p = 0.1$ ), smoking ( $p = 0.07$ ), unhealthy diet ( $p = 0.9$ ), sedentary lifestyle ( $p = 0.6$ ), hypertension ( $p = 0.4$ ), and BMI ( $p = 0.7$ ).

## Study 3. Serum monocyte chemoattractant protein-1 levels, liver inflammation and subclinical atherosclerosis in patients with NASH

**Introduction:** There are very few studies that have assessed serum MCP-1 levels in patients with NAFLD, but none to study the relationship between MCP-1 and subclinical atherosclerosis in patients with NASH. The objectives of this study were: to determine serum MCP-1 levels in patients with NASH; to assess the association between MCP-1 and biochemical

parameters, lipid profile, insulin levels and insulin resistance; to assess the association between MCP-1 and cardiovascular risk factors; to establish correlations between serum MCP-1 levels and VFT; to establish correlations between serum MCP-1 levels and c-IMT.

**Material and methods:** The study included 50 patients with NASH and 30 control subjects fulfilling the inclusion and exclusion criteria and the ethical criteria mentioned above. Serum MCP-1 antibodies were measured using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

**Results:** Serum MCP-1 levels were statistically significantly higher in patients with NASH vs. control group and they were even more elevated when serum AST and ALT levels were higher. Of the conventional cardiovascular risk factors (age, gender, smoking, sedentarism, dyslipidemia, hypertension, diabetes mellitus), only hypertension, obesity and dyslipidemia were statistically significantly associated with higher serum levels of MCP-1. There was a positive correlation between serum MCP-1 levels and total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, HOMA-IR, VFT, CA, BMI and a negative correlation between serum MCP-1 levels and HDL cholesterol. Univariate analysis showed that patients with increased c-IMT had statistically significantly higher levels of MCP-1 (554.4 (321, 893.3) pg/ml) than patients with normal c-IMT (313.1 (276.4, 399.2) pg/ml). Serum MCP-1 was significantly positively correlated with c-IMT ( $r=0.432$ ,  $p<0.001$ ).

Multiple linear regression analysis showed that NASH and HOMA-IR were independently associated with increased serum levels of MCP-1 ( $\beta$  coefficient 0.180;  $p=0.003$ ; respectively  $\beta$  coefficient 0.049;  $p=0.002$ ), this relationship being independent of high c-IMT.

#### Study 4. Assessment of cardiovascular risk by measuring IMT in patients with NASH

**Introduction:** The objectives of this study were to assess: the presence of cardiovascular risk by Doppler ultrasound c-IMT measurement in the two study groups; the presence of ATS plaques and their associations with cardiovascular risk factors, biochemical parameters, lipid profile, insulin levels and insulin resistance; associations between IMT and both conventional and new (Hcy) cardiovascular risk factors, biochemical parameters, insulin levels and insulin resistance; associations between IMT and markers of oxidative stress.

**Material and methods:** The study type, the study population and the methods were described in the general methodology section. The determination of Hcy and oxidative stress parameters was described in Study 2.

**Results:** Patients with NASH had a c-IMT significantly higher than control group (0.9 mm vs. 0.6 mm). Atherosclerotic plaque were only present in patients with NASH. The prevalence of plaques in patients with NASH was 14.2%. While studying the prevalence of ATS plaques, we observed that it was influenced by age, the presence of insulin resistance, hypertension and obesity. The analysis of conventional cardiovascular risk factors showed that only hypertension, sedentary lifestyle, obesity and dyslipidemia were more common in patients with NASH than in the control group. Of the patients with NASH, 25 (11 women and 14 men) (50%) were hypertensive (19 of them were on antihypertensive therapy) and 5 (1 woman and 4 men) had type 2 diabetes (but none was on insulin therapy). Univariate analysis showed that conventional cardiovascular risk factors associated with increased IMT were old age, smoking, unhealthy diet, physical inactivity, insulin resistance, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hypertension, higher CA, VFT and LDL-cholesterol levels and lower HDL-cholesterol levels. The presence of MS was associated with a significant increase in c-IMT. Of the new cardiovascular factors, Hcy was not statistically significantly associated with c-IMT although patients with NASH had statistically significantly increased serum levels of Hcy compared to the control group. There was a positive correlation between the increase in c-IMT and the increase in AST ( $r=0.377$ ;  $p=0.01$ ) and ALT ( $r=0.263$ ;  $p=0.01$ ). In univariate analysis, c-IMT was significantly associated with lower serum levels of total and reduced glutathione, GSH/GSSG ratio and GPx activity. Multiple linear regression analysis showed that after the adjustment of cardiovascular risk factors (age, gender, smoking, BMI, SM), NASH was independently associated with high c-IMT (OR 13.9, 95% CI, 1.9 to 99,  $p<0.001$ ). Other independent predictors of c-IMT were HOMA-IR ( $p=0.006$ ) and age ( $p=0.001$ ).

---

## General conclusion

1. The prevalence of MS and IR was higher in patients with NASH;
2. More than half of patients with NASH had at least three components of MS;
3. Abdominal obesity, hypertension and lower HDL-cholesterol levels were the most common components of MS in patients with NASH;
4. The only factor independently associated with the presence of MS was IR;
5. There was a positive correlation between insulin resistance, assessed using HOMA-IR index, and abdominal obesity and elevated transaminase levels;
6. VFT was the only factor independently associated with IR;
7. The increase in BMI was the only factor independently associated with the increase in VFT;
8. Abdominal obesity was associated with enhanced IR, transaminase levels and disruption of lipid metabolism;
9. Visceral fat thickness (VFT) measured by ultrasound proves to be a very good independent predictor of NASH and simple and noninvasive ultrasound method for the assessment of abdominal obesity;
10. Patients with NASH had elevated serum Hcy levels compared to controls, independent of age, gender, smoking status, unhealthy diet, DM, IR, serum levels of vitamin B6, B12 and folate;
11. Serum Hcy levels was positively correlated with physical inactivity, hypertension, obesity, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and elevated LDL cholesterol levels;
12. Mild HHcy is probably caused by the altered transsulfuration pathway as a result of impaired hepatic metabolism of NASH;
13. Patients with NASH had an increase in oxidative stress compared to the control group, as evidenced by lower reduced and total glutathione levels, reduced GSH/GSSG ratio, GPx activity and increased levels of lipid peroxidation products - MDA;
14. Decreased levels of reduced and total glutathione were associated with increased HOMA IR index, which may reflect the close association and interdependence between IR and OS, the two main mechanisms involved in the pathogenesis of NASH;
15. Reduced GSH levels and GSH/GSSG ratio was associated with physical inactivity, obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, hypoHDL-cholesterolemia and elevated transaminases levels (indicating the contribution of OS to the occurrence of hepatic necroinflammation);
16. There was a negative correlation between serum Hcy levels and reduced and total glutathione levels, GSH/GSSG ratio and SOD activity, which proves that HHcy enhances OS in patients with NASH;
17. NASH was independently associated with both the increase in serum levels of Hcy and the decrease in GSH;
18. Metabolic abnormalities present in patients with NASH (obesity, dyslipidemia, insulin resistance) are associated with reduced levels of antioxidants.
19. Determination of serum Hcy levels may also be useful as a marker of liver dysfunction, as well as an indicator of increased oxidative stress in patients with NASH.
20. Patients with NASH had elevated serum levels of MCP-1, which is due to abdominal obesity, IR and liver inflammation;
21. There is a mutual interdependence between IR, hepatic inflammation and MCP-1;
22. The liver is both a source and a target of certain pro-inflammatory factors, such as MCP-1;
23. Determination of serum MCP-1 levels can be used as a marker of hepatic inflammation;
24. Among cardiovascular risk factors, only hypertension, obesity and dyslipidemia were statistically significantly associated with increased MCP-1 serum levels;
25. Although serum levels of MCP-1 were positively associated with increased c-IMT, MCP-1 can not be used as a marker of cardiovascular risk in patients with NASH;

26. Finding some pharmacological agents to block the MCP-1 receptor could be a new therapeutic strategy in patients with NASH;
27. Cardiovascular risk factors associated with NASH were: hypertension, obesity, dyslipidemia and physical inactivity;
28. NASH is an independent cardiovascular risk factor;
29. The increased risk of cardiovascular events in NASH is proved by the increase in c- IMT;
30. Atherosclerotic plaques were only present in patients with NASH. There was a 14.2% prevalence of ATS plaques in patients with NASH and it was associated with old age, insulin resistance, hypertension and obesity;
31. Increased c-IMT was associated with the following cardiovascular risk factors: age, smoking, hypertension, abdominal obesity, MS, hypercholesterolemia, higher LDL-cholesterol levels, hypertriglyceridemia and lower HDL- cholesterol levels;
32. Increased c-IMT was associated with hepatic necro-inflammation, which may be one of the connections between NASH and subclinical ATS;
33. Factors independently associated with the increased risk of cardiovascular events assessed by ultrasound measurement of IMT were age, insulin resistance and the presence of NASH;
34. Hcy can not be regarded as a new cardiovascular risk factor in patients with NASH;
35. Doppler ultrasound measurement of carotid intima-media thickness (IMT) is a simple and non-invasive assessment of the risk of cardiovascular events in patients with NASH;
36. Early cardiovascular risk assessment in patients with NASH is important as CVD is the main cause of morbidity and mortality in these patients.

