

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Ficatul gras non-alcoolic asociat  
cu sindromul metabolic: risc  
major pentru boala  
aterosclerotică

---

Doctorand **Mihai Alexandru Munteanu**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Petru Adrian Mircea**

---



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

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Ficatul gras non-alcoolic</b>	19
1.1. Definiție	19
1.2. Epidemiologie	19
1.3. Patogeneză	20
1.4. Istorie naturală	25
1.5. Manifestări cliniceDefiniție	26
1.6. Determinări paraclinice	27
1.7. Asocieri clinice	29
1.8. Tratament	31
1.8.1. Dieta și modificările stilului de viață	32
1.8.2. Terapia farmacologică	33
<b>2. Sindromul metabolic</b>	37
<b>3. Ateroscleroza</b>	39
<b>4. Ficatul gras non-alcoolic, ateroscleroza, sindromul metabolic și boala cardiovasculară</b>	41
4.1. Asocieri între ficatul gras non-alcoolic și boala cardiovasculară	41
4.1. Mecanisme care stau la baza asocierii între ficatul gras non-alcoolic și boala cardiovasculară	42
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru și obiective</b>	47
<b>2. Metodologie generală</b>	47
<b>3. Studiul 1 – Riscul dezvoltării evenimentelor cardiovasculare, la pacienții cu sindrom metabolic izolat, respectiv la pacienții cu ficat gras non-alcoolic, asociat sau nu cu sindromul metabolic</b>	57
3.1. Introducere	57
3.2. Ipoteza de lucru	60
3.3. Material și metodă	60
3.4. Rezultate	61
3.5. Discuții	67

3.6. Concluzii	70
<b>4. Studiul 2 – Factori de risc clinici și serologici pentru dezvoltarea aterosclerozei subclinice la pacienții cu sindrom metabolic izolat, și la cei cu ficat gras non-alcoolic, asociat sau nu cu sindromul metabolic</b>	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteza de lucru	75
4.3. Material și metodă	75
4.4. Rezultate	76
4.4.1. Legătura dintre biomarkerii inflamatori (IL-6, IL-18), adipocitokinele (adiponectină, leptină), FRCV clasici și creșterea GIMc la toți pacienții incluși în studiu	76
4.4.2. Legătura dintre biomarkerii inflamatori (IL-6, IL-18), adipocitokinele (adiponectină, leptină), FRCV clasici și creșterea GIMc la nivelul fiecărui lot (FGNA cu SM, FGNA fără SM, SM izolat, FGNA cu și fără SM, martori)	80
4.4.3. Legătura dintre diabetul zaharat și/sau glicemia bazală modificată și creșterea GIMc	84
4.6. Discuții	85
4.7. Concluzii	88
<b>5. Studiul 3 – Factori de risc clinici și serologici, asociați cu dezvoltarea și progresia ficatului gras non-alcoolic și a sindromului metabolic</b>	91
5.1. Introducere	91
5.2. Ipoteza de lucru	93
5.3. Material și metodă	93
5.4. Rezultate	94
5.4.1. Corelația dintre biomarkerii inflamatori, adipocitokine și ficatul gras non-alcoolic	94
5.4.2. Corelația dintre FRCV clasici și ficatul gras non-alcoolic	95
5.5. Discuții	102
5.6. Concluzii	107
<b>6. Studiul 4 – Asocierea dintre ficatul gras non-alcoolic, sindromul metabolic și dezvoltarea aterosclerozei, din perspectiva factorilor de risc evidențiați clinic, serologic și imagistic</b>	109
6.1. Introducere	109
6.2. Ipoteza de lucru	110
6.3. Material și metodă	111
6.4. Rezultate	111

6.5. Discuții	115
6.6. Concluzii	118
<b>7. Discuții generale</b>	121
<b>8. Concluzii generale</b>	125
<b>9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	127
<b>REFERINȚE</b>	129

## Cuvinte cheie:

Ficat gras non-alcoolic, Steatoză hepatică, Steatohepatită non-alcoolică, sindrom metabolic, ateroscleroza, grosime intimă medie carotidiană, risc cardiovascular, boala cardiovasculară

## INTRODUCERE

Ficatul gras non-alcoolic (FGNA) reprezintă spectrul afecțiunilor hepatice care constau în infiltrarea grasă a ficatului (peste 5 % din hepatocite - steatoză), injurie hepatocitară constând în steatoză, necroză focală și inflamație (steatohepatită non alcoolică - SHNA), cu evoluție spre fibroză și ciroză. Se estimează că, la momentul actual, în lume există aproximativ 1 miliard de persoane care prezintă FGNA.

Patogeneza FGNA este complexă și este incomplet elucidată până în prezent. La ora actuală se consideră că mecanismul injuriei hepatocitare din cadrul FGNA este rezultatul unor agresiuni multiple (teoria "agresiunilor multiple paralele"), agresiuni survenite simultan, în principal de la nivelul țesutului adipos și al intestinului (microflora intestinală). Insulino-rezistența (IR) este definită ca incapacitatea insulinei de a transporta glucoza la nivelul celulelor țintă. Pacienții cu FGNA prezintă IR hepatică, musculară și la nivelul țesutului adipos, ceea ce face ca IR să joace un rol major în patogeneza FGNA. Întrebarea care se ridică este de ce unii pacienți dezvoltă steatoză simplă, iar alții SHNA ?

Istoria naturală a FGNA este dependentă de modificările histopatologice inițiale. În rândul pacienților cu steatoză hepatică simplă mortalitatea față de populația generală nu este diferită. În ceea ce privește pacienții cu SHNA, aceștia prezintă mortalitate crescută față de populația generală, atât în ceea ce privește mortalitatea legată de boala de ficat, dar mai ales în ceea ce privește mortalitatea legată de evenimentele cardiovasculare. Evenimentele cardiovasculare sunt principala cauză de mortalitate la pacienții cu SHNA, urmate de mortalitatea legată de malignitate și abia apoi, mortalitatea legată de bolile de ficat. SHNA este la ora actuală pe locul 3 în rândul cauzelor de transplant hepatic în SUA, după infecția cu virus C (HCV) și boala alcoolică a ficatului și este de așteptat ca în următorii ani să devină indicația principală. În acest context, evenimentele cardiovasculare post-transplant capătă o deosebită importanță, neștiindu-se cum va evolua riscul cardio-vascular (RCV) post-transplant.

Tratamentul FGNA este domeniul în care s-au înregistrat cele mai puține progrese în ultimii ani. La această ora, în anul 2016, după 36 de ani de la descrierea inițială a bolii, încă nu există un preparat farmacologic universal aprobat pentru folosință în FGNA. Tratamentul se bazează pe slăbire în greutate și modificarea stilului

de viață, iar, în cazuri atent selecționate, terapie farmacologică. Dilema clinicienilor este care categorie necesită monitorizare și care necesită tratament farmacologic, ținând cont că acesta nu este lipsit de efecte secundare.

Există, la ora actuală, în literatură, convingerea că FGNA ar fi parte din sindromul metabolic (SM), mai exact, că FGNA ar fi manifestarea hepatică a SM.

Mecanismele care stau la baza asocierii între FGNA și boala cardio-vasculară (BCV) nu sunt pe deplin elucidate. Aceasta asociere, totuși, merită o atenție deosebită, dat fiind faptul că, acești pacienți sunt la risc pentru a deceda datorită afectării cardiovasculare, mai degrabă decât a hepatopatiei.

Dar este asocierea între FGNA și BCV o consecință a împărțirii aceluiași factori de risc sau prin sine, FGNA, confera un RCV crescut independent de acești factori ? Cât de des ar trebui acești pacienți monitorizați din perspectiva RCV ? Cât de devreme trebuie intervenit terapeutic ? Care sunt pacienții care vor dezvolta afectare cardio-vasculară și care sunt cei care vor dezvolta boala avansată de ficat ? Îmbunătățirea statusului histologic hepatic atrage după sine o scădere a RCV ? Rezolvarea IR prin mijloace terapeutice duce la vindecarea FGNA și implicit la scăderea RCV ? Tratamentul agresiv al factorilor de risc este opțiune pentru toți pacienții cu FGNA ? Toate aceste întrebări așteaptă să își găsească răspunsul, dat fiind că FGNA este o afectare tot mai frecventă în zilele noastre, iar tendința este în continuare, de creștere.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

Cercetarea de față s-a desfășurat în perioada ianuarie 2014 – iunie 2015 și a fost una de tip prospectiv. Studiul s-a desfășurat în Clinica Medicală I, SCJU Cluj, secția Gastroenterologie, iar pacienții incluși în studiu au fost pacienți internați în Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj, secțiile Gastroenterologie, Gastroenterologie Spital de Zi, Medicină Internă I - din cadrul Clinicii Medicală I, și pacienți internați în secția clinică de Diabet Zaharat - Nutriție și Boli Metabolice. S-a obținut acordul Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Fiecare pacient inclus în studiu a semnat un acord de informare, prin care și-a dat acceptul de participare.

Pacienții incluși în studiu au fost împărțiți în 4 loturi: pacienți cu FGNA și SM, pacienți cu FGNA fără SM, pacienți cu SM (fără FGNA) și lotul martor. În total, 157 de pacienți au fost incluși în studiu, în toate cele 4 loturi. S-au exclus pacienți cu hepatopatii de altă cauză (virusuri hepatice B, C, hepatită autoimună, etiologie alcoolică, toxic-medicamentoasă, hepatopatii metabolice - hemocromatoză, boala Wilson), afectare malignă în prezent sau în antecedente, ateroscleroză manifestă în orice teritoriu (coronarian, periferic, cerebral), pierdere în greutate de 4kg sau mai mult pe parcursul ultimei luni.

Pacienții au fost evaluați clinic, biologic (determinări de laborator uzuale, la care s-au adăugat martori ai inflamației – IL-6 și IL-18 și adipocitokine – adiponectina și leptina; de asemenea, s-a efectuat determinarea Fibromax la pacienții cu FGNA), ecografic (ultrasonografie hepatică și carotidiană, cu măsurarea GIMc).

GIMc a fost măsurată ecografic, atât manual, cât și semi-automat, cu ajutorul unui software computerizat realizat în colaborare cu Universitatea Tehnică Cluj-Napoca.

Diagnosticul de FGNA s-a efectuat în urma examenului clinic, a determinărilor biologice și a documentării ecografice a steatozei hepatice. Pentru diagnosticul de SHNA s-a folosit determinarea Fibromax și, puncția biopsie hepatică în unele situații. SM a presupus prezența a trei din cele cinci criterii.

Analiza statistică a datelor s-a făcut atât folosind statistica descriptivă, cât și cea inferențială.

### **Studiul 1. Riscul dezvoltării evenimentelor cardiovasculare, la pacienții cu sindrom metabolic izolat, respectiv la pacienții cu ficat gras non-alcoolic, asociat sau nu cu sindromul metabolic**

**Scopul studiului.** Obiectivul acestui studiu a fost de a identifica pacienții cu cel mai crescut risc de a dezvolta evenimente cardiovasculare, prin evidențierea GIMc, dintre cei cu SM izolat sau cei cu FGNA, asociat sau nu cu SM. Totodată, s-a avut în vedere identificarea RCV suplimentar pe care cei cu SHNA îl poartă, față de cei cu FGNA, dar fără SHNA.

**Material și Metodă.** Pacienții incluși în studiu au fost împărțiți în 4 loturi: 1. Lotul 1- FGNA cu SM, Lotul 2 - FGNA, Lotul 3- SM, Lotul 4 - martori, respectându-se criteriile de includere și excludere pentru fiecare lot în parte care au fost enumerate mai sus. S-a respectat metodologia descrisă pentru diagnosticul de FGNA, SM, SHNA, precum și pentru măsurarea GIMc.

**Rezultate.** Cele mai mari valori ale GIMc s-au înregistrat în rândul pacienților cu SM, față de cei cu FGNA (cu și fără SM) și de pacienții din grupul martor (test Kruskal-Wallis, parametru test  $\chi^2(2)=26.64$ ,  $p<0.001$ ). Pacienții cu FGNA și SM au avut valori mai mari ale GIMc față de cei cu FGNA (test Mann-Whitney, parametru test  $U=708.50$ ,  $p=0.002$ ), dar fără diferență statistic semnificativă față de cei cu SM (test Mann-Whitney, parametru test  $U=407.50$ ,  $p=0.21$ , media rangurilor 35,97 versus 42,89). Pacienții cu SHNA, dintre cei cu FGNA, au avut valori mai mari ale GIMc decât cei fără SHNA (test Mann-Whitney, parametru test  $U=225,000$ ,  $p=0,025$ ). În momentul în care s-a efectuat analiza pe fiecare lot de FGNA, cu și fără SM, prezența SHNA nu a mai influențat valoarea GIMc (FGNA și SM - test Mann-Whitney, parametru test  $U=9,500$ ,  $p=0,228$ ; FGNA fără SM - test Mann-Whitney, parametru test  $U=120,500$ ,  $p=0,326$ ).

**Concluzii.** Pacienții care prezintă SM au valori mai crescute ale GIMc față de cei cu FGNA și față de pacienții martori, ceea ce ilustrează valoarea SM ca și factor de risc cardiovascular. Adăugarea SM la pacienții cu FGNA predispozează la o valoare mai

crescută a GIMc față de cei cu FGNA fără SM. Dacă însă se adaugă FGNA la pacienții cu SM, aceasta nu se traduce printr-un risc cardiovascular crescut, exprimat prin GIMc. În rândul pacienților cu FGNA, odată SHNA prezentă, există un risc cardiovascular crescut, indiferent dacă se asociază sau nu SM.

## **Studiul 2. Factori de risc clinici și serologici pentru dezvoltarea aterosclerozei subclinice la pacienții cu sindrom metabolic izolat, și la cei cu ficat gras non-alcoolic, asociat sau nu cu sindromul metabolic**

**Scopul studiului.** Obiectivul acestui studiu este de a identifica factorii de risc, clinici și serologici, asociați cu dezvoltarea și progresia aterosclerozei subclinice, exprimată prin cuantificarea GIMc.

**Material și Metodă.** Pacienții incluși în studiu au fost împărțiți în 4 loturi: 1. Lotul 1- FGNA cu SM, Lotul 2 - FGNA, Lotul 3- SM, Lotul 4 - martori, respectându-se criteriile de includere și excludere pentru fiecare lot în parte care au fost enumerate mai sus. S-a respectat metodologia descrisă pentru diagnosticul de FGNA, SM, SHNA, precum și pentru măsurarea GIMc. Determinarea IL-6, IL-18, adiponectina și leptina s-a efectuat conform metodologiei descrise mai sus.

**Rezultate.** Între nivelele biomarkerilor studiați (adipocitokine - adiponectina, leptina și markeri de inflamație - IL-6, IL-18), și modificările martorului de ateroscleroză subclinică, GIMc, nu s-a constatat nici o corelație statistic semnificativă, nici când a fost luat în considerare întreg lotul de pacienți, nici pe fiecare lot în parte. Când s-a evaluat aportul factorilor de risc clasici la creșterea GIMc, pe întreg lotul de pacienți, variabilitatea GIMc a fost influențată de: IMC ( $\rho=0,29$ ,  $p<0,001$ ), circumferință abdominală ( $\rho=0,402$ ,  $p<0,001$ ), prezența și gradul HTA ( $\rho=0,509$ ,  $p<0,001$ ), colesterol total ( $\rho=0,205$ ,  $p=0,01$ ), LDL-colesterol ( $\rho=0,21$ ,  $p=0,009$ ), TGL ( $\rho=0,181$ ,  $p=0,023$ ), GGT ( $\rho=0,246$ ,  $p=0,008$ ). De asemenea, a existat o corelație negativă între GIMc și HDL-colesterol ( $\rho=-0,176$ ,  $p=0,027$ ), precum și Cl Cr ( $\rho=-0,217$ ,  $p=0,006$ ). La pacienții cu FGNA și SM, valoarea GIMc este influențată de prezența și gradul HTA ( $\rho=0,497$ ,  $p<0,001$ ). La pacienții cu FGNA, fără SM, valoarea GIMc este influențată de nivelul GGT, valoarea care a fost aproape să atingă semnificația statistică ( $\rho=0,303$ ,  $p=0,065>0,05$ ). La pacienții cu SM, valoarea GIMc a fost influențată de circumferința abdominală ( $\rho=0,511$ ,  $p=0,015$ ). Valoarea GIMc nu a fost influențată de prezența diabetului zaharat și a glicemiei bazale modificate, nici la nivelul întregului lot, nici pe fiecare lot în parte.

**Concluzii.** Utilitatea markerilor inflamatori (IL-6, IL-18), precum și a unor adipocitokine (adiponectina, leptina) în identificarea aterosclerozei subclinice s-a dovedit a fi limitată. Pacienții cu afecțiuni metabolice (SM, FGNA), au nevoie de o caracterizare complexă, din perspectiva prezenței factorilor de risc cardiovasculari, mai ales că raportul cost-beneficiu este unul avantajos. În anumite etape ale afectării metabolice, există unul sau mai mulți factori de risc care au o pondere semnificativă în stabilirea riscului cardiovascular. FGNA, fără SM, pare să constituie un stadiu de



afectare metabolică incipientă. Pe măsură ce afectarea metabolică progresează, ponderea factorilor de risc cardiovasculari în stabilirea riscului cardiovascular este diferită. Pentru cuantificarea corectă a riscului cardiovascular, inclusiv în cadrul definiției SM, trebuie făcută distincția între pacienții cu diabet zaharat și cei cu glicemie bazală modificată, aceste două categorii, aflându-se, probabil, într-o stare de afectare metabolică diferită, fapt ce conferă și un risc cardiovascular diferit.

### **Studiul 3. Factori de risc clinici și serologici, asociați cu dezvoltarea și progresia ficatului gras non-alcoolic și a sindromului metabolic**

**Scopul studiului.** Obiectivul acestui studiu este de a identifica factorii de risc, clinici și serologici, asociați cu dezvoltarea și progresia ficatului gras non-alcoolic și de a cuantifica rolul constituenților sindromului metabolic pentru dezvoltarea și progresia ficatului gras non-alcoolic.

**Material și Metodă.** Pacienții incluși în studiu au fost împărțiți în două loturi: Lotul 1 - FGNA cu SM, Lotul 2 - FGNA fără SM. Criteriile de includere și excludere pentru fiecare lot în parte au fost enumerate mai sus, în cadrul secțiunii Metodologie Generală. Metodologia diagnosticului de FGNA, precum și a măsurării GIMc au fost detaliate în secțiunea Metodologie Generală. Diagnosticul pozitiv de SHNA a fost stabilit fie pe baza investigației serologice Fibromax, la pacienții la care această investigație s-a efectuat, fie prin PBH.

**Rezultate.** La toți pacienții din studiu, cu FGNA, cu și fără SM, s-a identificat o corelație monotonă pozitivă, semnificativă statistic între gradul de steatoză și nivelele de leptină ( $\rho=0,3$ ,  $p=0,025<0,05$ ), aceste nivele fiind mai ridicate la pacienții cu steatoză mai severă. S-a identificat o bună corelație pozitivă între nivelele de IL-18 și SHNA ( $\rho=0,701$ ,  $p<0,001$ ), cei cu SHNA având valori ale IL-18 mai ridicate. Gradul de steatoză s-a corelat, semnificativ statistic, cu prezența SHNA ( $\rho=0,701$ ,  $p<0,001$ ), adică cu cât steatoza a fost mai severă, probabilitatea pentru prezența SHNA a fost mai mare. La toți pacienții cu FGNA, cu și fără SM, s-a identificat o corelație monotonă pozitivă moderată între gradul de steatoză și GIMc ( $\rho=0,30$ ,  $p=0,025<0,05$ ), HTA ( $\rho=0,31$ ,  $p=0,019<0,05$ ), GGT ( $\rho=0,44$ ,  $p=0,002<0,05$ ), TGL ( $\rho=0,45$ ,  $p<0,001$ ). S-a constatat o corelație monotonă pozitivă acceptabilă între gradul de steatoză și circumferința abdominală ( $\rho=0,52$ ,  $p<0,001$ ), IMC ( $\rho=0,66$ ,  $p<0,001$ ). De asemenea, a existat o corelație negativă moderată între gradul de steatoză și nivelul de HDL-colesterol ( $\rho=-0,46$ ,  $p<0,001$ ). În plus, s-a constatat o corelație monotonă pozitivă moderată între gradul de fibroză și valoarea GIMc ( $\rho=0,47$ ,  $p<0,001$ ), GGT ( $\rho=0,32$ ,  $p=0,025<0,05$ ) și HTA ( $\rho=0,43$ ,  $p=0,001<0,05$ ). La pacienții cu FGNA și SM, gradul de steatoză nu a atins o corelație statistic semnificativă cu nici unul din factorii de risc, iar gradul de fibroză s-a corelat cu valoarea GIMc ( $\rho=0,595$ ,  $p=0,004<0,05$ ). La cei cu FGNA fără SM, gradul de steatoză a atins o corelație statistic semnificativă cu circumferința abdominală ( $\rho=0,699$ ,  $p<0,001$ ), IMC ( $\rho=0,745$ ,  $p<0,001$ ), TGL ( $\rho=0,338$ ,  $p=0,047<0,05$ ), Cl Cr

( $\rho=0,342$ ,  $p=0,045<0,05$ ). A existat o corelație negativă între gradul de steatoză și HDL colesterol ( $\rho=-0,619$ ,  $p<0,001$ ). Gradul de fibroză s-a corelat cu valoarea GIMc ( $\rho=0,376$ ,  $p=0,026<0,05$ ). Prezența SHNA a fost influențată de IMC ( $t(57)=4,46, p<0,001$ ), LDL colesterolul ( $t(57)=-1,83, p=0,033$ ), CI Cr ( $t(50,71)=2,62, p=0,012$ ), circumferința abdominală (test Mann-Whitney  $U=99,50$ ,  $p<0,001$ ), GGT (test Mann-Whitney,  $U=122,00$ ,  $p=0,002<0,05$ ), TGL (test Mann-Whitney,  $U=223,0$ ,  $p=0,024<0,05$ ), respectiv nivelele scăzute de HDL (test Mann-Whitney,  $U=123,50$ ,  $p<0,001$ ). Nu s-a identificat nici o legătură semnificativă statistic între prezența diabetului zaharat sau a GBM și SHNA (test Chi-patrat, parametru test  $\chi^2=0,75$ ,  $df=1$ ,  $p=0,388>0,05$ ).

**Concluzii.** Determinarea nivelului leptinei ar putea fi un bun indicator al severității hepatopatiei, din punctul de vedere al steatozei, și ar putea folosi la monitorizarea în dinamică a pacienților. IL-18 s-a corelat cu prezența SHNA, rezultat ce face din această determinare un posibil indicator al prezenței SHNA la pacienții cu FGNA. GIMc s-a corelat atât cu gradul de steatoză, cât și cu cel de fibroză, ceea ce face din această investigație o unealtă importantă în evaluarea severității hepatopatiei. Faptul că corelația s-a menținut, inclusiv în analiza separată a loturilor de FGNA, cu și fără SM, este o dovadă a utilității acestei determinări ca și indicator de severitate a hepatopatiei.

#### **Studiul 4. Asocierea dintre ficatul gras non-alcoolic, sindromul metabolic și dezvoltarea aterosclerozei, din perspectiva factorilor de risc evidențiați clinic, serologic și imagistic**

**Scopul studiului.** Obiectivele acestui studiu sunt de a cuantifica riscul de dezvoltare a aterosclerozei la pacienții cu ficat gras non-alcoolic, cu sau fără sindrom metabolic, de a identifica o strategie de screening pentru pacienții cu ficat gras non-alcoolic care sunt expuși la apariția evenimentelor cardiovasculare și de a identifica un moment optim în evoluția hepatopatiei pentru intervenția terapeutică, astfel încât să se poată preveni apariția evenimentelor cardiovasculare.

**Material și Metodă.** Pacienții incluși în acest studiu au fost împărțiți în 2 loturi: Lotul 1- FGNA cu SM și Lotul 2 – FGNA, fără SM. Criteriile de includere și excludere pentru fiecare lot în parte au fost enumerate mai sus, în cadrul secțiunii Metodologie Generală. Metodologia diagnosticului de FGNA, SM, precum și a măsurării GIMc au fost detaliate în secțiunea Metodologie Generală. GIMc  $> 0,12$ cm a avut semnificația de placă aterosclerotică. Pentru diagnosticul de SHNA, determinarea gradului de steatoză și a celui de fibroză s-a efectuat testul Fibromax.

**Rezultate.** A existat o corelație monotonă pozitivă între valoarea GIMc și gradul steatozei (coeficient de corelație  $0,296$ ,  $p=0,027<0,05$ ), respectiv gradul de fibroză (coeficient de corelație  $0,466$ ,  $p<0,001$ ), la toți pacienții cu FGNA, fie ei cu sau fără SM. Au existat scoruri mai mari ale gradului de fibroză la pacienții cu placă aterosclerotică decât la cei fără placă aterosclerotică, rezultat care a atins semnificația statistică (test

Mann Whitney ,  $U=131,00$ ,  $P<0,001$ ; media rangurilor 39,58 vs 24,48). Nu s-a identificat o corelație statistic semnificativă între prezența plăcii aterosclerotice și sexul pacienților (test Chi-patrat,  $\chi^2(1)=0.30$ ,  $p=0.638$ ), nivelul de colesterol total (test Mann-Whitney,  $U=738.000$ ,  $p=0,438$ ), LDL-colesterol (test Student t,  $t(91)=0.67$ ,  $p=0,505$ ), HDL-colesterol (test Student t,  $t(93)=0.75$ ,  $p=0,458$ ), trigliceride (test Mann-Whitney,  $U=803,500$ ,  $p=0,911$ ). Conform modelului logistic multivariabil de predicție a plăcii aterosclerotice, a rezultat că gradul fibrozei a fost un predictor cu efect pozitiv asupra prezenței plăcii aterosclerotice (la pacienții cu aceleași caracteristici ale covariatelor din model, iar o creștere cu o unitate a gradului fibrozei determină o creștere de 7.19 ori a riscului de a avea placă aterosclerotică), în timp ce pentru gradul steatozei și prezența SHNA, nu au existat suficiente dovezi pentru a confirma efectul acestora asupra șansei de a dezvolta placă aterosclerotică ( $p>0.05$ ).

**Concluzii.** La pacienții cu FGNA, gradul de fibroză hepatică este constituenții histologic care influențează cel mai mult prezența plăcii aterosclerotice. Există mecanisme de acțiune suplimentare, sau cel puțin, diferite, pentru dezvoltarea aterosclerozei, la pacienții cu FGNA față de populația generală, ținând cont că factorii de risc cardiovasculari clasici nu se asociază cu un risc cardiovascular crescut. La pacienții cu FGNA, modificările aterosclerotice ilustrate de prezența plăcii aterosclerotice, se oglindesc și la nivel renal, prin scăderea CI Cr. Modelul final multivariabil de predicție al prezenței plăcii aterosclerotice la pacienții cu FGNA a fost influențat de prezența și gradul fibrozei și de vârstă, HTA, circumferința abdominală, IMC și CI Cr. Cu ajutorul acestui model s-a reușit identificarea cu exactitate a 91,1% dintre pacienții cu și fără plăci aterosclerotice, rezultat care face din modelul realizat unul utilizabil în practica clinică. Screening-ul pacienților cu FGNA în vederea dezvoltării BCV trebuie să includă pacienții cu SHNA. Dezvoltarea fibrozei, și în special a fibrozei avansate constituie un punct de cotitură, care trebuie materializat prin măsuri terapeutice ferme. Ținând cont că prezența SHNA este un indicator pentru necesitatea inițierii farmacoterapiei, dezvoltarea fibrozei ar trebui privită ca un indicator de necesitate a unei a doua linii terapeutice. Dificultatea acestei recomandări constă în faptul că, până la această oră, nu există terapie specifică, recomandată, pentru tratamentul FGNA și a SHNA. FGNA ar trebui inclus în criteriile de definire ale SM.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Prin această cercetare s-a încercat ilustrarea legăturii dintre afecțiunea hepatică (FGNA) și riscul dezvoltării BCV printr-o manieră inovativă, făcându-se distincția între pacienții cu FGNA și cei care, pe lângă FGNA, asociază și SM. S-a realizat această delimitare tocmai pentru a se putea ilustra cât mai fidel legătura cu BCV a FGNA încă dintr-un stadiu incipient al afectării metabolice.

Evaluarea fiecărui pacient inclus în studiu pornit de la două aspecte extrem de importante: severitatea hepatopatiei și severitatea leziunilor aterosclerotice aflate în stadiul premergător manifestărilor clinice.

În evaluarea pacienților cu FGNA s-a încercat integrarea utilizării ecografiei vasculare prin măsurarea ecografică a GIMc, o abordare potențial utilă în practica clinică curentă. Am dovedit, astfel, că măsurarea GIMc este un instrument bun și util pentru cuantificarea RCV al pacienților cu FGNA.

Prin utilizarea markerilor inflamatori (IL-6, IL-18) și adipocitokinelor (adiponectina și leptina) am dovedit că utilitatea acestor determinări serologice este de folos, dar și limitată, în funcție de gradul afectării metabolice și de severitatea leziunilor aterosclerotice.

S-a ilustrat că anumiți FRCV pot avea o contribuție diferită în stabilirea RCV, pe măsură ce afecțiunea lor metabolică progresează, ceea ce face ca asupra acestor FRCV să poată fi orientate măsuri terapeutice specifice pentru combaterea lor.

Cercetarea de față a oferit un argument suplimentar pentru redefinirea SM, atât prin includerea printre constituenții SM a FGNA, cât și prin necesitatea separării pacienților cu DZ de cei cu GBM. S-a propus totodată o definiție nouă pentru SM, definiție care necesită însă validare în studii ulterioare.

---

PhD THESIS. ABSTRACT

# Non-alcoholic fatty liver disease associated with metabolic syndrome: major risk for atherosclerosis

---

PhD Student **Mihai Alexandru Munteanu**

---

PhD Scientific Coordinator Prof.dr. **Petru Adrian Mircea**

---



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

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>CURRENT STATUS OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Non-alcoholic fatty liver disease</b>	19
1.1. Definition	19
1.2. Epidemiology	19
1.3. Pathogenesis	20
1.4. Natural history	25
1.5. Clinical manifestations	26
1.6. Paraclinic determinations	27
1.7. Clinical associations	29
1.8. Treatment	31
1.8.1. Diet and lifestyle modifications	32
1.8.2. Pharmacological therapy	33
<b>2. Metabolic syndrome</b>	37
<b>3. Atherosclerosis</b>	39
<b>4. Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome, atherosclerosis and cardiovascular disease</b>	41
4.1. Associations between non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease	41
4.1. Mechanisms between non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease	42
<b>ORIGINAL STUDY</b>	
<b>1. Objectives</b>	47
<b>2. Material and method - general</b>	47
<b>3. Study no. 1 - The risk of developing cardiovascular events, in patients with isolated metabolic syndrome and in patients with non-alcoholic fatty liver disease, with or without metabolic syndrome</b>	57
3.1. Introduction	57
3.2. Aim of study	60
3.3. Material and method	60
3.4. Results	61

3.5. Discussion	67
3.6. Conclusions	70
<b>4. Study no. 2 – Serological and clinical risk factors for the development of subclinical atherosclerosis in patients with isolated metabolic syndrome, and in patients with non-alcoholic fatty liver, with or without metabolic syndrome</b>	<b>73</b>
4.1. Introduction	73
4.2. Aim of study	75
4.3. Material and method	75
4.4. Results	76
4.4.1. The link between inflammatory biomarkers (IL-6, IL-18), adipocytokines (adiponectine, leptine), classics CVRF and increased CIMT in all patients included in the study	76
4.4.2. The link between inflammatory biomarkers (IL-6, IL-18), adipocytokines (adiponectine, leptine), classics CVRF and increased CIMT in each study arm (NAFLD with MS, NAFLD without MS, isolated MS, NAFLD with and without MS, controls)	80
4.4.3. The link between diabetes and/or IFG and increased CIMT	84
4.6. Discussion	85
4.7. Conclusions	88
<b>5. Study no. 3 – Serological and clinical risk factors associated with the development and progression of non-alcoholic fatty liver and metabolic syndrome</b>	<b>91</b>
5.1. Introduction	91
5.2. Aim of study	93
5.3. Material and method	93
5.4. Results	94
5.4.1. The correlation between inflammatory biomarkers (IL-6, IL-18), adipocytokines (adiponectine, leptine) and non-alcoholic fatty liver disease	94
5.4.2. The correlation between classics CVRF and non-alcoholic fatty liver disease	95
5.5. Discussion	102
5.6. Conclusions	107
<b>6. Study no. 4 – The combination of non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and atherosclerosis development, from the perspective of clinical, serological and imagistic risk factors</b>	<b>109</b>
6.1. Introduction	109
6.2. Aim of study	110
6.3. Material and method	111
6.4. Results	111

6.5. Discussion	115
6.6. Conclusions	118
<b>7. Final discussion</b>	121
<b>8. Final conclusions</b>	125
<b>9. Originality of research and innovative contribution</b>	127
<b>REFERENCES</b>	129



## **Key words:**

Non-alcoholic fatty liver disease, hepatic steatosis, non-alcoholic steatohepatitis, metabolic syndrome, atherosclerosis, carotid intima-media thickness, cardiovascular risk, cardiovascular disease

## **INTRODUCTION**

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents the spectrum of liver diseases which consist of simple steatosis (fatty infiltration of more than 5% of hepatocytes), non-alcoholic steatohepatitis (hepatocyte injury consisting of steatosis, focal necrosis and inflammation) – NASH, which may lead to fibrosis and cirrhosis. It is estimated that, currently, in the world, there are approximately 1 billion people with NAFLD.

The pathogenesis of NAFLD is complex and not fully known. Nowadays, it is considered that the mechanism of hepatocyte injury is the result of multiple and simultaneous assaults (the "multiple parallel hits" hypothesis), which occurred mainly from the adipose tissue and from the gut (intestinal microflora). Insulin-resistance (IR) is defined as the inability of insulin to transport glucose inside the target cells. NAFLD patients develop hepatic, muscular and adipose tissue IR, which makes the IR to play a major role in the pathogenesis of NAFLD. The question that arises is why some people develop only simple steatosis while others develop NASH?

The natural history of NAFLD is dependent on the initial histopathological changes. Among patients with simple steatosis, the mortality is not different from that recorded in the general population. Regarding patients with NASH, there is increased mortality as compared to the general population, both related to the liver disease, and especially due to cardiovascular events. Cardiovascular events are the leading cause of death in patients with NASH, followed by malignancy related mortality and liver related mortality. NASH is currently in third place among the causes for liver transplantation in the US, right after the infection with HCV and alcoholic liver disease. NASH is expected to become the main indication for liver transplantation in the years to come. In this context, post-transplant cardiovascular events acquire particular importance, because it is not known how cardiovascular risk (CVR) will evolve post-transplantation.

The treatment of NAFLD is the area where the slowest advances have occurred in recent years. Today, in 2016, 36 years after the initial description of the disease, there is still no approved drug for the treatment of NAFLD. Treatment is based on weight reduction and lifestyle changes, and in carefully selected cases, pharmacological

therapy. The dilemma of the clinicians is that which patients require monitoring and which patients require pharmacological treatment, given that the therapy is not without side effects.

Data from the literature support that NAFLD is part of the metabolic syndrome (MS), and that NAFLD is the hepatic manifestation of the MS.

The mechanisms linking NAFLD with cardiovascular disease (CVD) are not fully understood yet. Attention must be paid to this association, given that these patients are more likely to die due to heart disease rather than liver disease.

Is NAFLD associated with CVD as a result of the sharing of common risk factors or does NAFLD itself confer an increased cardiovascular risk independent of these factors? How often should these patients be monitored in terms of cardiovascular risk and how early should we intervene? Which patients will develop cardiovascular disease and which patients will develop advanced liver disease? Will improved liver histological status decrease the CVR? Will therapeutic IR improvement lead to the cure of NAFLD and subsequently lower CVR? Aggressive treatment of cardiovascular risk factors is an option for all patients with NAFLD? All these questions are waiting to find an answer, given that NAFLD is more and more frequent, and the trend is still growing.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

The current research took place at The 1<sup>st</sup> Medical Clinic, Emergency County Hospital Cluj-Napoca, Gastroenterology Department, between January 2014 – June 2015 in a prospective format. The patients included in the study were patients hospitalized to the Gastroenterology Department, Gastroenterology Day hospital, Internal Medicine I Department and to the Diabetes Department. The studies were approved by the Ethical Committee of the “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca. Each patient included in the study sign an informed consent.

Eligible patients were divided in 4 arms: patients with NAFLD and MS, patients with NAFLD without MS, patients with MS without NAFLD and controls. In total, 157 patients were included in the study. Patients with other hepatopathies (HCV or HBV infection, autoimmune hepatitis, drug induced liver disease, alcoholic liver disease, hemochromatosis, Wilson disease), past or current malignancy, symptomatic atherosclerosis (coronarian, peripheral, cerebral), weight loss of 4kg or more in the last month were excluded.

Patients were assessed clinically, biologically (routine laboratory findings, to which were added inflammatory markers - IL-6 and IL-18 and adipocytokines - adiponectine and leptine, also Fibromax was performed in patients with NAFLD), and by ultrasound (hepatic ultrasound and carotid ultrasound with CIMT measurement).

CIMT was measured by ultrasound, both manually and semi-automatically using a computerized software developed in collaboration with the Technical University of Cluj-Napoca.

NAFLD was diagnosed clinical examination, biological determinations and ultrasound documentation of hepatic steatosis. For the diagnosis of NASH Fibromax was used and in some cases, liver biopsy was used. MS diagnosis was made by the presence of three out of five criteria.

The statistical analysis was descriptive and inferential.

### **Study no. 1 – The risk of developing cardiovascular events, in patients with isolated metabolic syndrome and in patients with non-alcoholic fatty liver disease, with or without metabolic syndrome**

**Aim.** The objective of this study was to identify patients at higher risk of developing cardiovascular events by highlighting CIMT among those with isolated MS or those with NAFLD, with or without MS. Simultaneously, we search if NASH predispose to higher CVR than patients with NAFLD but no NASH.

**Material and method.** Patients were divided into four arms: Arm 1. NAFLD with MS, Arm 2 – NAFLD without MS, Arm 3 – MS without NAFLD, Arm 4 – controls. Inclusion and exclusion criteria were explained earlier. The diagnosis methodology for NAFLD, NASH and MS was detailed in the section above. The methodology for the CIMT measurement was detailed in the section above.

**Results.** The highest value of CIMT were in the MS arm, then in NAFLD arm and then in controls (Kruskal-Wallis test,  $\chi^2(2)=26.64$ ,  $p<0.001$ ). Patients with NAFLD and MS had higher values of CIMT than those with NAFLD without MS (Mann-Whitney test,  $U=708.50$ ,  $p=0.002$ ), but with no statistical significant difference than those with isolated MS (Mann-Whitney,  $U=407.50$ ,  $p=0.21$ ). Those with NASH had higher values of CIMT than those with NAFLD but no NASH (Mann-Whitney,  $U=225,000$ ,  $p=0,025$ ). NASH did not influence CIMT when the analysis was made separately, in those with NAFLD and MS and those with NAFLD without MS (NAFLD with MS - Mann-Whitney test,  $U=9,500$ ,  $p=0,228$ ; NAFLD without MS - Mann-Whitney test,  $U=120,500$ ,  $p=0,326$ ).

**Conclusions.** Patients presenting with MS have higher values of CIMT than those with NAFLD and controls, which illustrates the value of MS as a cardiovascular risk factor. Adding MS in patients with NAFLD increased the CIMT compared to those with NAFLD without MS. But if NAFLD is added in patients with MS, this does not translates into an increased cardiovascular risk, expressed by increased CIMT. Among patients with NAFLD, NASH increases the cardiovascular risk, whether or not MS is present.

### **Study no. 2 – Serological and clinical risk factors for the development of subclinical atherosclerosis in patients with isolated metabolic syndrome, and in patients with non-alcoholic fatty liver, with or without metabolic syndrome**

**Aim.** The objective of this study is to identify clinical and serological risk factors associated with the development and progression of subclinical atherosclerosis, expressed by quantifying CIMT.

**Material and method.** Patients were divided into four arms: Arm 1. NAFLD with MS, Arm 2 – NAFLD without MS, Arm 3 – MS without NAFLD, Arm 4 – controls. Inclusion and exclusion criteria were explained earlier. The diagnosis methodology for NAFLD, NASH and MS was detailed in the section above. The methodology for the CIMT measurement was detailed in the section above. The methodology of IL-6, IL-18, adiponectine, leptine determinations was detailed above.

**Results.** There was no statistical significant correlation between adiponectine, leptine, IL-6, IL-18 and CIMT nor when it was considered the whole group of patients, nor in each arm. In the whole group of patients CIMT was influenced by BMI ( $\rho=0,29$ ,  $p<0,001$ ), abdominal circumference ( $\rho=0,402$ ,  $p<0,001$ ), HT ( $\rho=0,509$ ,  $p<0,001$ ), total cholesterol ( $\rho=0,205$ ,  $p=0,01$ ), LDL-cholesterol ( $\rho=0,21$ ,  $p=0,009$ ), TGL ( $\rho=0,181$ ,  $p=0,023$ ), GGT ( $\rho=0,246$ ,  $p=0,008$ ). There was a negative correlation between CIMT and HDL-cholesterol ( $\rho=-0,176$ ,  $p=0,027$ ) and Cr Cl ( $\rho=-0,217$ ,  $p=0,006$ ). In patients with NAFLD and MS, CIMT is influenced by HT ( $\rho=0,497$ ,  $p<0,001$ ). In patients with NAFLD without MS, CIMT is influenced by GGT, but this did not reach statistical significance ( $\rho=0,303$ ,  $p=0,065>0,05$ ). In patients with MS, CIMT is influenced by abdominal circumference ( $\rho=0,511$ ,  $p=0,015$ ). CIMT was not influenced by diabetes or by impaired fasting glucose, nor when it was considered the whole group of patients, nor in each arm.

**Conclusions.** The utility of inflammatory markers (IL-6, IL-18) and of adipocytokines (adiponectine, leptine) to identify subclinical atherosclerosis was shown to be limited. Patients with metabolic disorders such as MS and/or NAFLD, require a complex characterization in terms of the presence of cardiovascular risk factors, given the fact that the cost-benefit ratio is favorable. In certain stages of the metabolic damage, there are one or more risk factors that have a significant weight in determining the cardiovascular risk. NAFLD without MS appears to be an early stage of metabolic impairment. While the metabolic impairment progresses, the proportion of the cardiovascular risk factors in determining the cardiovascular risk is different. To quantify the correct cardiovascular risk, including in the definition of MS, one should distinguish between patients with diabetes and those with impaired fasting glucose, because these two categories are probably in a different state of metabolic impairment, which gives a different cardiovascular risk.

### **Study no. 3 – Serological and clinical risk factors associated with the development and progression of non-alcoholic fatty liver and metabolic syndrome**

**Aim.** The objective of this study is to identify clinical and serological risk factors associated with the development and progression of NAFLD and to quantify the role of MS constituents for the development and progression of NAFLD.

**Material and method.** Patients were divided into two arms: Arm 1. NAFLD with MS, Arm 2 – NAFLD without MS. Inclusion and exclusion criteria were explained earlier. The diagnosis methodology for NAFLD, NASH and MS was detailed in the section above. The methodology for the CIMT measurement was detailed in the section above. The methodology of IL-6, IL-18, adiponectine, leptine determinations was detailed above. NASH was determined either by Fibromax either by liver biopsy.

**Results.** In all NAFLD patients, with and without MS, there was a monotone positive correlation between the degree of steatosis and leptine ( $\rho=0,3$ ,  $p=0,025<0,05$ ). Patients with more severe steatosis had higher leptine levels. There was a good positive correlation between IL-18 and NASH ( $\rho=0,701$ ,  $p<0,001$ ). Patients with NASH had higher IL-18 values than patients with NAFLD but no NASH. There was a correlation between the degree of steatosis and NASH, the more severe the steatosis, the more likely for NASH to be present ( $\rho=0,701$ ,  $p<0,001$ ). There was a monotone positive correlation between the degree of steatosis and CIMT ( $\rho=0,30$ ,  $p=0,025<0,05$ ), HT ( $\rho=0,31$ ,  $p=0,019<0,05$ ), GGT ( $\rho=0,44$ ,  $p=0,002<0,05$ ), TGL ( $\rho=0,45$ ,  $p<0,001$ ). There was an acceptable monotone positive correlation between the degree of steatosis and abdominal circumference ( $\rho=0,52$ ,  $p<0,001$ ) and BMI ( $\rho=0,66$ ,  $p<0,001$ ). There was a moderate negative correlation between the degree of steatosis and HDL-cholesterol ( $\rho=-0,46$ ,  $p<0,001$ ). There was a moderate monotone positive correlation between the degree of fibrosis and CIMT ( $\rho=0,47$ ,  $p<0,001$ ), GGT ( $\rho=0,32$ ,  $p=0,025<0,05$ ) and HT ( $\rho=0,43$ ,  $p=0,001<0,05$ ). In patients with NAFLD and MS, the degree of steatosis did not reach a correlation with any studied risk factors, but the degree of fibrosis correlated with CIMT ( $\rho=0,595$ ,  $p=0,004<0,05$ ). In patients with NAFLD without MS, the degree of steatosis correlated with abdominal circumference ( $\rho=0,699$ ,  $p<0,001$ ), BMI ( $\rho=0,745$ ,  $p<0,001$ ), TGL ( $\rho=0,338$ ,  $p=0,047<0,05$ ), Cr Cl ( $\rho=0,342$ ,  $p=0,045<0,05$ ). There was a negative correlation between the degree of steatosis and HDL-cholesterol ( $\rho=-0,619$ ,  $p<0,001$ ). The degree of fibrosis correlated with CIMT ( $\rho=0,376$ ,  $p=0,026<0,05$ ). NASH was influenced by BMI ( $t(57)=4.46, p<0.001$ ), LDL-cholesterol ( $t(57)=-1.83, p=0.033$ ), Cr Cl ( $t(50.71)=2.62, p=0.012$ ), abdominal circumference (Mann-Whitney test,  $U=99.50$ ,  $p<0.001$ ), GGT (Mann-Whitney test,  $U=122.00$ ,  $p=0.002<0,05$ ), TGL (Mann-Whitney test,  $U=223.0$ ,  $p=0.024<0,05$ ), and low HDL-cholesterol (Mann-Whitney test,  $U=123.50$ ,  $p<0.001$ ). There was no correlation between NASH and diabetes or impaired fasting glucose.

**Conclusions.** Determining the level of leptin could be a good indicator of liver disease severity in terms of steatosis, and could be used for monitoring the patients. IL-18 was correlated with the presence of NASH, which makes this determination a possible indicator of the presence of NASH in patients with NAFLD. CIMT correlated with the degree of steatosis and fibrosis, which makes this investigation an important tool in assessing the severity of liver disease. Given that the correlated maintained in

both arms of the study is an indicator of the utility of this determination in assessing liver disease severity.

**Study no. 4 – The combination of non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and atherosclerosis development, from the perspective of clinical, serological and imagistic risk factors**

**Aim.** The objectives of this study are to quantify the risk of developing atherosclerosis in patients with NAFLD with or without MS, to identify a screening strategy for patients with NAFLD who are exposed to the occurrence of cardiovascular events and to identify the optimal moment in the evolution of the liver disease for therapeutical intervention, in order to prevent cardiovascular events.

**Material and method.** Patients were divided into two arms: Arm 1. NAFLD with MS, Arm 2 – NAFLD without MS. Inclusion and exclusion criteria were explained earlier. The diagnosis methodology for NAFLD and MS was detailed in the section above. The methodology for the CIMT measurement was detailed in the section above. Carotid plaque was considered in CIMT > 0,12cm. NASH was determined either by Fibromax.

**Results.** There was a positive correlation between CIMT and the degree of steatosis ( $\rho=0,296$ ,  $p=0,027<0,05$ ) and fibrosis ( $\rho=0,466$ ,  $p<0,001$ ) in all patients with NAFLD, with or without MS. Patients with carotid plaque had more severe fibrosis than those without plaque (Mann Whitney test,  $U=131,00$ ,  $p<0,001$ ; 39,58 vs 24,48). There was no correlation between carotid plaque and sex (Chi-squared test,  $\chi^2(1)=0,30$ ,  $p=0,638$ ), total cholesterol (Mann-Whitney test,  $U=738,000$ ,  $p=0,438$ ), LDL-cholesterol (Student test t,  $t(91)=0,67$ ,  $p=0,505$ ), HDL-cholesterol (Student test t,  $t(93)=0,75$ ,  $p=0,458$ ), TGL (Mann-Whitney test,  $U=803,500$ ,  $p=0,911$ ). According to the predictive multivariable logistic model of atherosclerotic plaque, the degree of fibrosis was a predictor with a positive effect on the presence of atherosclerotic plaque (for patients with the same characteristics of covariances of the model; an increase of one unit for the degree of fibrosis causes an increase of 7.19 times for the risk of having atherosclerotic plaque). For the degree of steatosis and the presence of NASH there were not enough evidences to confirm their effect on the chance of developing atherosclerotic plaque ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions.** In patients with NAFLD, the degree of liver fibrosis is the histologically constituent which has the most influence for the presence of atherosclerotic plaque. There are additional mechanisms of action, or at least different ones, for the development of atherosclerosis in patients with NAFLD compared to the general population, given that classic cardiovascular risk factors are not associated with an increased cardiovascular risk. In patients with NAFLD, atherosclerotic changes illustrated by the presence of carotid plaque, are present also at the vascular renal level, changes illustrated by the decrease of Cr Cl. The final predictive multivariable logistic model of atherosclerotic plaque in patients with NAFLD was influenced by the presence and degree of fibrosis, age, hypertension, abdominal circumference, BMI and

Cr CI. With this model, we were able to accurately identify 91.1% of patients with and without atherosclerotic plaques, which makes this model one that can be used in clinical practice. The Screening of NAFLD patients to develop cardiovascular disease should include patients with NASH. The development of fibrosis, particularly of advanced fibrosis, is a turning point, which should be materialized through strong therapeutic measures. Considering that the presence of NASH is an indicator for the need to initiate pharmacotherapy, fibrosis development should be regarded as an indicator for the need of initiating second-line therapy. The difficulty of this recommendation is that, by this time, there is no specific therapy recommended for the treatment of NASH. NAFLD should be included in the criteria for the definition of MS.

## **Originality of research and innovative contribution**

Through this research, we tried to illustrate the link between liver disease (NAFLD) and the risk of developing CVD through an innovative manner, by distinguishing between patients with NAFLD and those with NAFLD and MS. We made this distinction in order to illustrate the link between NAFLD and CVD at a very early stage of metabolic damage.

The assessment of each patient enrolled in the study started from two extremely important issues: the severity of liver disease and the severity of atherosclerotic lesions, in the stage preceding the clinical manifestations.

In the assessment of patients with NAFLD we tried to integrating the use of vascular ultrasound, by measuring CIMT, which is a potentially useful approach to daily clinical practice. We proved that CIMT measurement is a good and useful tool for quantification the CVR in patients with NAFLD.

By using inflammatory markers (IL-6 , IL-18) and adipocytokines (adiponectine and leptine) we have proved that the usefulness of these serological markers is helpful, but limited, depending on the degree and severity of both atherosclerotic lesions and metabolic damage.

It has been shown that certain CVRF may have a different contribution in establishing CVR, as their metabolic disease progresses, which makes these CVRF to be specifically targeted using therapeutic measures in order to combat them.

This research has provided an additional argument for redefining MS, both by including NAFLD and by the need to separate patients with diabetes from those with impaired fasting glucose. We also proposed a new definition for MS, definition that requires validation in further studies.