
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Asocierea nivelurilor hormonilor
alimentari și a tesutului adipos
disfuncțional cu sindromul
metabolic și ficatul gras
nonalcoolic diagnosticat ecografic

Doctorand Maria Petrescu

Conducător de doctorat Prof.dr. Monica Popa



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Ficatul gras nonalcoolic, componenta prevalenta a SM	17
1.1. Introducere	17
1.2. Relația dintre elementele SM și FGNA	18
1.3. Fiziopatologia inflamației și a țesutului adipos disfuncțional	18
1.4. Progresia FGNA spre forma severă a acesteia, SHNA	21
2. Contribuția grelinei în patogeneza FGNA	23
2.1. Introducere	23
2.2. Grelina în legătură cu perturbările metabolismului lipidic și glucidic din cadrul FGNA	24
2.3. Grelina și inflamația din cadrul FGNA	24
2.4. Inter-relaționarea grelinei cu rezistența la insulină în patogeneza FGNA	25
2.5. Inter-relaționarea grelinei cu țesutul adipos disfuncțional din cadrul FGNA	26
2.6. Contribuția grelinei la progresia FGNA spre SHNA	28
3. Rolul sistemului imun în patogeneza FGNA	29
3.1. Sistemul complement în patogeneza FGNA și SHNA	30
3.2. Relația dintre sistemul imun și adipokinele implicate în patogeneza FGNA	31
3.3. Sistemul imun și grelina în cadrul FGNA	32
3.4. Sistemul imun și țesutul adipos disfuncțional	33
4. Scoruri predictive ale FGNA și SHNA	35
4.1. Scoruri predictive de apariție a FGNA	35
4.2. Scoruri de predicție ale apariției fibrozei hepatice în rândul pacienților cu FGNA	36
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Studiul 1 – Relația dintre nivelurile serice ale adipochinelor, hormonilor alimentari și SM, precum și implicarea indicilor antropometrici	41
1.1. Introducere	41
1.2. Obiective	42

1.3 Ipoteză de lucru	42
1.4. Subiecți și metodă	43
1.5. Rezultate	46
1.6. Discuții	74
1.7. Concluzii	82
2. Studiul 2 – Analiza hormonilor alimentari, a sistemului imun și a indicilor antropometrici la un grup de subiecți cu FGNA, comparativ cu fără FGNA	85
2.1. Introducere	85
2.2. Obiective	86
2.3 Ipoteză de lucru	86
2.4. Subiecți și metodă	87
2.5. Rezultate	89
2.6. Discuții	99
2.7. Concluzii	105
3. Studiul 3 – Hormonii alimentari, probele biologice uzuale, RGC-32 și indicii antropometrici – posibili predictorii ai severității steatozei hepatice	107
3.1. Introducere	107
3.2. Obiective	108
3.3. Ipoteză de lucru	108
3.4. Subiecți și metodă	109
3.5. Rezultate	112
3.5.1. Caracteristicile pacienților cu steatoză hepatică	112
3.5.2. Corelații între severitatea steatozei și indicii antropometrici	103
3.5.3. Corelații între severitatea steatozei și profilul glucidic, lipidic și rezistența la insulină	115
3.5.4 Corelații între severitatea steatozei și hormonii alimentari, sistemul imun și sindromul inflamator	117
3.6. Discuții	119
3.7. Concluzii	124
4. Concluzii generale	127
5. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	131
REFERINȚE	135

Cuvinte cheie : ficat gras nonalcoolic, hormoni alimentari, adipokine

INTRODUCERE

Obezitatea reprezintă o problemă majoră de sănătate publică datorită prevalenței ridicate generate de comportamentul alimentar nesănătos și creșterii sedentarismului.

Steatoza hepatică se asociază cu factori de risc metabolic, precum obezitatea, rezistența la inulină (RI), dislipidemia și hipertensiunea arterială (HTA), părți componente ale SM. Studiile continuă să fie contradictorii în ce privește legătura dintre FGNA și evenimentele cardiovasculare dar sunt certe în ce privește rolul predictor al FGNA în apariția DZ tip 2.

Țesutul adipos disfuncțional este un puternic predictor al bolilor cardiovasculare, diabetului zaharat tip 2 (DZ tip 2), sindromului metabolic (SM), dar și a componentei prevalente a acestuia, ficatul gras nonalcoolic (FGNA), postulându-se faptul că indicii antropometrici ar putea constitui unele valoroase în predicția activității necroinflamatorii hepatice. Tulburările producției de adipokine prin disfuncționalitatea țesutului adipos dar și prin hormonii alimentari (grelina și leptina) au constituit subiect de cercetare al multor studii dar rolul lor în patogeneza FGNA și SM este complex și incomplet elucidat.

Importanța continuării cercetării privind contribuția adipokinelor și a hormonilor alimentari la patogeneza SM și a FGNA derivă și din faptul că studiile recente le identifică ca fiind posibile ținte terapeutice. Adiponectina prezintă un rol protector în patogeneza FGNA, însă, rolul leptinei nu este pe deplin stabilit. Unii cercetători au identificat o activitate duală a leptinei în FGNA, antisteatotică inițial, ulterior proinflamatorie și profibrotică, în schimb alți cercetători au constatat că leptina contribuie la steatoză, inflamație și fibroză. O activitate duală a fost constatăată și la grelină, prosteatotică inițial, ulterior antiinflamatorie și antifibrotică. Fetuina A pare să aibă un rol în patogeneza FGNA, dar nu se cunoaște rolul ei în fibroza hepatică. Un alt element în patogeneza FGNA este sistemul complement, prin fracțiunea acestuia, Response to gene complement-32 (RGC-32), însă, relația lui cu adipokinele și hormonii alimentari este controversată, la fel și acțiunea RGC-32 în patogeneza FGNA.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii este cuprins în 4 capitole. În aceste capitole sunt redate cele mai importante și actuale date din literatura de specialitate referitoare la FGNA.

Primul capitol, Ficatul gras nonalcoolic, componenta prevalentă a SM, constă în definirea FGNA, ipotezele postulate, fiziopatologia inflamației și a țesutului adipos

disfuncțional în cadrul FGNA. De asemenea, am explicat relația dintre elementele SM și FGNA și am prezentat impactul epidemiologic și prevalența componentelor SM la subiecții cu FGNA. Tot în primul capitol am încercat să readucem în atenție datele recente privind fiziopatologia progresiei FGNA spre forma severă, SHNA.

Contribuția grelinei în patogeneza FGNA a constituit al doilea capitol al stadiului actual al cunoașterii. În acest capitol am încercat să explicăm legătura grelinei cu perturbările metabolismului lipidic și glucidic din cadrul FGNA dar și cu alte mecanisme fiziopatologice incriminate în patogeneza FGNA, precum efectele grelinei asupra inflamației, rezistenței la insulină (RI) și a țesutului adipos disfuncțional.

Al 3-lea capitol, Rolul sistemului imun în patogeneza FGNA, explică datele recente referitoare la efectele sistemului imun asupra disfuncției hepatocitare metabolice. De asemenea, am dezbătut și efectele sistemului complement, prin fracțiunea acestuia, RGC-32 în patogeneza FGNA dar și relația dintre sistemul imun și adipokinele implicate în disfuncționalitatea hepatocitară. Totodată, am analizat studii recente privind relația dintre sistemul imun și grelină dar și între sistemul imun și disfuncționalitatea țesutului adipos, ca și elemente etiopatogenetice ale FGNA.

Ultimul capitol, Scoruri predictive ale FGNA și SHNA arată importanța clinică și paraclinică acordată acestei patologii asimptomatice. Acest capitol a fost subdivizat în două subcapitole, primul dezbătând scoruri predictive de apariție a FGNA, unele din ele fiind în practica clinică de apreciere a fibrozei, respectiv cirozei hepatice (precum steatotest), altele sunt încă în curs de validare, celălalt subcapitol arătând scoruri care să prezică apariția fibrozei din cadrul FGNA. Acest capitol este de o utilitate clinică deosebită, pentru că utilizează probe biologice uzuale, ușor accesibile oricărui clinician, care să permită diagnosticarea FGNA dar și apariția fibrozei hepatice, astfel încât să fie selectați cu o acuratețe cât mai mare subiecții care necesită explorări laborioase, costisitoare și care nu sunt ușor accesibile.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Relația dintre nivelurile serice ale adipochinelor, hormonilor alimentari și sindromul metabolic precum și implicarea indicilor antropometrici

Introducere. SM include obezitatea, DZ tip 2, tulburarea toleranței la glucoză, RI, alterarea profilului lipidic și anomalii cardiovasculare. Există studii care încearcă să evalueze comportamentul adipochinelor dar și valoarea diagnostică a lor în cadrul elementelor SM. Adiponectina, cunoscută cu efecte benefice, prezintă niveluri serice

mai mici la subiecții cu SM, în schimb, leptina, prezintă niveluri serice mai mari la subiecții cu SM. Studiile recente au arătat că luate împreună, prezintă o valoare diagnostică mai mare, decât fiecare separat. Publicațiile din literatură prezintă rezultate contradictorii în ce privește efectele grelinei asupra profilului lipidic, unele arătând o relație direct proporțională între grelină și profilul lipidic, altele prezentând o relație invers proporțională. Fetuina A prezintă relații direct proporționale cu elementele profilului glucidic din cadrul SM dar și cu profilul dismetabolic, precum nivelurile serice de trigliceride.

Ipoieza de lucru / obiective. Unul dintre scopurile acestui studiu a fost stabilirea nivelurilor serice ale hormonilor alimentari (grelina și leptina), adipokinelor (adiponectina) și hepatokinelor (fetuina A) la subiecții cu SM, comparativ cu cei fără SM. Un alt scop a fost evaluarea nivelului seric al grelinei, leptinei, fetuinei A și adiponectinei, în funcție de prezența sau absența fiecărui element al SM (HTA, DZ tip 2, obezitate, niveluri serice mari de trigliceride și mici de HDL colesterol). De asemenea, ne-am propus să efectuăm corelații între elementele obezității (respectiv, indicii antropometrici) cu elementele RI și profilul dismetabolic, cât și să evaluăm comportamentul adipokinelor și a hormonilor alimentari în cadrul fibrozei din FGNA, evaluată prin fibromax.

Subiecți și metodă. Participanții la studiu au fost recrutați în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie “Prof. Dr. Octavian Fodor”, Cluj-Napoca, în perioada martie-decembrie 2015. Studiul a fost de tip prospectiv, analitic, observational și a cuprins un număr de 60 subiecți, din care 20 prezentau elementele SM, 40 subiecți nu prezentau elementele SM. Toți subiecții au fost evaluați pe baza unei fișe de studiu care a inclus date demografice, clinice și paraclinice.

Rezultate. Comparând cele 2 loturi (cu și fără SM), noi am aratat media valorilor indicilor antropometrici mai mare la lotul cu SM, comparativ cu cel fără SM, rezultatele fiind semnificative statistic, cu o variație a lui p între 0.001 și 0.007. Chiar dacă nu au fost semnificative statistic, leptina și fetuina A au fost mai mari la lotul cu SM, în schimb, grelina și adiponectina au fost mai mici la lotul cu SM. Divizând subiecții în funcție de fiecare element al SM, am constatat că lotul de subiecți cu DZ tip 2 au prezentat niveluri serice mai mari de grelină, leptină, fetuină A, nesemnificative statistic, în schimb am obținut semnificație statistică pentru adiponectină, care a fost mai mică la lotul de subiecți diabetici. Divizând loturile în funcție de prezența sau absența HTA, am obținut niveluri serice de leptină, adiponectină și fetuină A mai mari la subiecții hipertensivi, iar grelina mai mică. Efectuând comparații între subiecții obezi și cei nonobezi am constatat că grelina, leptina și fetuina A au prezentat niveluri serice mai mari la subiecții obezi, în schimb, adiponectina a prezentat niveluri serice mai mici la subiecții obezi, rezultatele nefiind semnificative statistic. Am obținut semnificație statistică și cu tendință la semnificație statistică atunci când am analizat corelațiile dintre grelină și IMC, perimetrul taliei, între leptină și perimetrul taliei respectiv procentul de țesut adipos, între adiponectină și IMC respectiv raportul dintre

perimetrul taliei și șoldului dar și între fetuina A și perimetrul taliei respectiv raportul dintre perimetrul taliei și șoldului, cu valori ale p cuprinse între 0.002 și 0.078. Divizând loturile de subiecți în funcție de prezența sau absența hipertrigliceridemie, un alt element important al SM, am constatat că subiecții cu hipertrigliceridemie au prezentat niveluri serice mai mari ale grelinei și fetuinei A, respectiv mai mici ale leptinei. Adiponectina este mai mică la subiecții cu hipertrigliceridemie, cu semnificație statistică ($p=0.02$). Referindu-ne la ultimul element al SM, hipoHDL colesterol, am constatat că subiecții cu hipoHDL colesterol au prezentat niveluri serice mai mari ale leptinei și fetuinei A dar fără semnificație statistică iar cu semnificație statistică am obținut rezultate mai mici pentru grelină și pentru adiponectină, cu valori p de 0.006 și 0.05. Raportându-ne la fibroza din cadrul FGNA, cuantificată prin fibromax, am constatat semnificație statistică în ce privește leptina, fiind mai mare la subiecții fără fibroză. Grelina și fetuina A au fost, de asemenea, mai mari la subiecții fără fibroză hepatică iar adiponectina mai mare la cei cu fibroză hepatică.

Concluzii. Aceste rezultate pun în evidență complexitatea relației dintre adipochine, hepatochine și hormonii alimentari în raport cu SM dar și cu fiecare element al SM, cât și cu fibroza din cadrul FGNA.

Studiul 2. Analiza hormonilor alimentari, a sistemului imun și a indicilor antropometrici la un grup de subiecți cu FGNA, comparativ cu un grup fără FGNA

Introducere. Steatoza hepatică prezintă o provocare pentru cercetare din punct de vedere al strategiilor de prevenție, diagnostic și tratament, având în vedere că este o patologie asimptomatică din punct de vedere clinic. Deși steatoza hepatică prezintă proporții epidemice mari, nu s-au validat mijloace diagnostice care să înlocuiască biopsia hepatică. Studiile recente acordă o atenție deosebită țesutului adipos care este considerat un element principal în patogeneza FGNA, fiind responsabil de producția de adipochine, printre care leptina, care va fi dezbătută în acest studiu. Grelina este un hormon alimentar, produs de mucoasa tubului digestiv, al cărui rol în patogeneza FGNA nu este pe deplin stabilit. Unii cercetători au constatat că are o acțiune prostateatică, respectiv antiinflamatorie și antifibrotică, alții, în schimb, nu au avut aceleași constatări. În ultima perioadă, un interes deosebit este acordat și sistemului complement, prin fracțiunea acestuia, RGC-32, cu rol în proliferare, diferențiere și fibroză celulară dar și în cancerogeneză. Dietele calorice bogate au dus la creșterea RGC-32 la nivelul țesutului adipos. Studiile experimentale au constatat o activitate proinflamatorie a RGC-32 la nivelul endoteliului vascular iar deleția experimentală a RGC-32 a dus la regresia obezității, ameliorarea sensibilității insulinice și reducerea citokinelor proinflamatorii.

Ipoteză de lucru / obiective. Având în vedere rezultatele primului studiu, am considerat important să evaluăm hormonii alimentari și în cadrul FGNA documentată ultrasonografic (US). De asemenea, ne-am propus să evaluăm markerii RI, fracțiunea

complementului-RGC-32 dar și indicii antropometrici la subiecții cu FGNA, comparativ cu cei fără FGNA.

Subiecți și metodă. Pacienții care au participat la acest studiu au fost recrutați din rândul celor care s-au prezentat la Clinica Medicală 4, spitalul Clinic CF, Cluj-Napoca, în perioada aprilie 2021-mai 2022. Studiul a fost de tip prospectiv, analitic, observațional și a inclus un număr de 77 subiecți, divizați în 2 loturi cu și fără FGNA obiectivată US. Lotul martor a fost ales respectând genul lotului de studiat și vârsta \pm 2 ani.

Rezultate. Indicii antropometrici, respectiv indicele de masă corporală, circumferința abdominală, circumferința șoldului și a coapsei au fost mai mari la subiecții cu FGNA comparativ cu cei fără FGNA, semnificativ statistic și cu tendință la semnificație statistică, cu o valoare p cuprinsă între 0.000 și 0.084. Valorile profilului glicemic au prezentat niveluri serice asemănătoare între cele două loturi, în schimb, elementele RI (indicele HOMA și insulinemia) au fost semnificativ statistic mai mari la lotul steatozic ($p=0.000$, respectiv $p=0.004$). Referindu-ne la hormonii alimentari, noi am constatat că grelina a fost semnificativ statistic mai mică la lotul cu FGNA comparativ cu cel fără FGNA (27.39 comparativ cu 190.93), cu o valoare $p=0.000$, iar leptina semnificativ statistic mai mare la lotul cu FGNA, comparativ cu cel fără FGNA (77.11 comparativ cu 48.32) cu o valoare $p=0.004$. Deși pentru RGC-32 nu am obținut semnificație statistică ($p=0.510$), studiul nostru a arătat niveluri serice mai mici ale RGC-32 la lotul steatozic comparativ cu cel fără steatoză.

Concluzii. Am obținut niveluri mai mari ale indicilor antropometrici și ale elementelor RI la subiecții cu FGNA, comparativ cu cei fără FGNA. Din punct de vedere al hormonilor alimentari, am arătat că grelina este mai mică la subiecții cu FGNA, pe când leptina este mai mare la cei cu FGNA. Dozarea ELISA a RGC-32 a arătat că subiecții cu FGNA prezintă niveluri serice mai mici comparativ cu cei fără FGNA, deși, studiile experimentale privind RGC-32 au constatat efecte dăunătoare în cadrul FGNA.

Studiul 3. Hormonii alimentari, probele biologice uzuale, RGC-32 și indicii antropometrici – ar putea fi predictorii ai severității steatozei hepatice

Introducere. FGNA și forma progresivă a acestuia, SHNA au devenit cele mai comune afecțiuni din lume. Netratată, poate progresa spre fibroză, ciroză hepatică, cercetările arătând procente îngrijorătoare ale cirozei hepatice metabolice (30-40%), devenind a doua cauză de transplant hepatic. Cercetările privind activitatea leptinei în ce privește progresia de la FGNA spre SHNA sunt contradictorii. Unele studii au constatat că în stadiile precece leptina prezintă proprietăți antisteatotice, pe când în stadiile avansate prezintă proprietăți proinflamatorii și profibrotice. Alte cercetări au constatat faptul că leptina posedă și proprietăți prosteatotice. În schimb, grelina prezintă proprietăți prosteatotice inițial, antiinflamatorii și antifibrotice ulterior. Un alt element implicat în patogeneza hepatică metabolică este reprezentat de sistemul

complement, prin fracțiunea acestuia RGC-32. Studiile murinice au arătat că induce inflamație și steatoză hepatică iar deleția experimentală a acestuia a arătat regresia leziunilor hepatice din cadrul FGNA.

Obiective / ipoteza de lucru. Unul din scopurile acestui studiu a fost să încercăm să stabilim o relație între severitatea steatozei hepatice, diagnosticate US și parametrii clinici și paraclinici în cadrul subiecților cu FGNA. De asemenea, ne-am propus să evaluăm posibilele conexiuni între severitatea steatozei hepatice și hormonii alimentari, RI, respectiv RGC-32.

Subiecți și metodă. Participanții la studiu au fost recrutați din rândul subiecților care s-au prezentat la Clinica Medicală IV, spitalul CF, Cluj-Napoca, tot în perioada aprilie 2021-mai 2022. Studiul realizat a fost de tip analitic, observațional, prospectiv și a cuprins un număr de 55 subiecți. Aceștia au fost divizați în 3 categorii, în funcție de severitatea steatozei cuantificată US: grupul 1, din care au făcut parte 36 subiecți cu steatoză ușoară; grupul 2, alcătuit din 16 subiecți cu steatoză medie și grupul 3, care a inclus 8 subiecți cu steatoză severă. S-au realizat analize comparative între cele 3 grupe de subiecți din punct de vedere al indicilor antropometrici, elementele profilului glicemic, al RI, hormonilor alimentari și RGC-32.

Rezultate. Indicii antropometrici s-au corelat direct proporțional cu gradele de severitate ale steatozei hepatice (IMC-ul, circumferința abdominală și circumferința șoldului), obținând semnificație statistică (valorile p au fost 0.01, 0.003, respectiv 0.01). Raportându-ne la metabolismul glucidic, am constatat tendință la semnificație statistică a valorilor glicemice, fiind mai mari la cei cu steatoză hepatică ușoară iar insulinemia a fost semnificativ statistic mai mare la cei cu steatoză ușoară. Chiar dacă nu am obținut întotdeauna semnificație statistică, am constatat că hormonii alimentari, grelina și leptina au prezentat niveluri serice mai mari la subiecții cu steatoză severă, comparativ cu cei cu steatoză ușoară. Frațiunea complementului reprezentată de RGC-32 a fost mai mare la subiecții cu steatoză ușoară comparativ cu cei cu steatoză severă.

Concluzii. Studiul nostru a relevat o relație direct proporțională între indicii antropometrici și severitatea steatozei hepatice cuantificată US. Analiza profilului glicemic și a elementelor RI a relevat o relație invers proporțională între acestea și severitatea steatozei hepatice. Hormonii alimentari s-au corelat direct proporțional cu severitatea steatozei hepatice iar nivelul seric al RGC-32 s-a corelat negativ cu severitatea steatozei hepatice.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

În această lucrare observăm variațiile adipokinelor și a hormonilor alimentari în funcție de elementele SM dar și în funcție de componenta prevalentă a acestuia, FGNA.

Aprofundarea cercetărilor privind variațiile adipokinelor, hormonilor alimentari, indicilor antropometrici în patogeneza SM dar și a FGNA ar putea ajuta la crearea de scoruri care să permită diagnosticarea și tratarea în stadii precoce a acestor afecțiuni, având în vedere că majoritatea elementelor SM dar și FGNA sunt asimptomatice din punct de vedere clinic.

Actuala teză a arătat, încă o dată importanța elementelor clinice de evaluare ale țesutului adipos cutanat și visceral, cunoscute cu rol în etiopatogeneza FGNA și SM. Astfel, am obținut corelații negative ale grelinei și adiponectinei cu elementele obezității iar leptina a prezentat corelații pozitive cu elementele obezității. Măsurarea indicilor antropometrici presupune un cost redus, este ușor accesibilă oricărui clinician, indiferent de specialitatea în care profesează și considerăm utilă introducerea lor în formule de calcul care să permită diagnosticarea SM și FGNA în stadii precoce.

Analiza hormonilor alimentari în funcție de prezența sau absența FGNA a relevat niveluri serice de grelină mai mici la lotul cu steatoză iar nivelurile serice de leptină au fost mai mari la cei cu steatoză hepatică. Considerăm deci, că grelina și leptina ar putea fi considerate unelte valoroase pentru medicii specialiști în selectarea subiecților care necesită explorări paraclinice costisitoare, precum fibromax, elastografie hepatică, rezonanță magnetică nucleară sau puncție biopsie hepatică. De asemenea, variațiile hormonilor alimentari atrag atenția asupra unui comportament alimentar neadecvat cu rol în etiopatogeneza acestei patologii asimptomatice. Un alt element important al actualei teze a fost evaluarea componentei imune în cadrul patogenezei FGNA, prin dozarea RGC-32 care a prezentat valori serice mai mari la lotul cu steatoză hepatică. Din câte cunoaștem noi, dozarea RGC-32 în patologia hepatică nu a fost studiată până în prezent. Aceste constatări sugerează că FGNA este o afectare metabolică cronică complexă cu o posibilă componentă imună.

Ultima parte a tezei a constatat creșteri direct proporționale ale elementelor clinice ale obezității, hormonilor alimentari cu severitatea steatozei hepatice. Referitor la fracțiunea sistemului complement, aceasta s-a corelat invers proporțional cu severitatea steatozei hepatice.

Aceasta teză și-a propus o abordare mai amplă a SM dar și a FGNA, pornind de la importanța elementelor clinice de diagnostic, evaluarea hormonilor alimentari și încercarea de a aborda unele strategii diagnostice noi, prin dozarea fracțiunii RGC-32 a sistemului complement. De asemenea această teză ridică ipoteze noi de cercetare care să permită stabilirea unor strategii diagnostice pentru FGNA în stadii precoce, astfel încât să se limiteze progresia spre fibroză, având în vedere datele epidemiologice îngrijorătoare și a faptului că devine a doua cauză de transplant hepatic.

Abstract of PhD Thesis

The correlation of digestive hormones levels and dysfunctional adipose tissue with metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease evidenced by ultrasonography

PhD student Maria Petrescu

PhD coordonator Prof. dr. Monica Popa



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Nonalcoholic fatty liver, the main component of metabolic syndrome	17
1.1. Introduction	17
1.2 Relation between MS and NAFLD elements	18
1.3 Pathophysiology of inflammation and dysfunctional adipose tissue	18
1.4 Progression of NAFLD to its severe form, NASH	21
2. Contribution of ghrelin to NAFLD pathogenesis	23
2.1. Introduction	23
2.2 Ghrelin association with lipid and glycemic metabolism disturbances in NAFLD	24
2.3 Ghrelin and inflammation in NAFLD	24
2.4 Correlation between ghrelin and insulin resistance in NAFLD pathogenesis	25
2.5 Correlation between ghrelin and dysfunctional adipose tissue in NAFLD	26
2.6 Contribution of ghrelin to the progression of NAFLD to NASH	28
3. The role of the immune system in NASH pathogenesis	29
3.1. Complement system in NAFLD and NASH pathogenesis	30
3.2 Relation between immune system and adipokines involved in NAFLD	31
3.3 Immune system and ghrelin in NAFLD	32
3.4 Immune system and dysfunctional adipose tissue	33
4. Predictive scores of NAFLD and NASH	35
4.1 Predictive scores of NAFLD onset	35
4.2. Predictive scores of liver fibrosis onset in patients with NAFLD	36
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Study 1 – Relationship between serum levels of adipokines, digestive hormones and MS, the role of anthropometric parameters	41
1.1. Introduction	41
1.2. Objectives	42

1.3 Working hypothesis	42
1.4. Subjects and method	43
1.5. Results	46
1.6. Discussion	74
1.7. Conclusions	82
2. Study 2 – Analysis of digestive hormones, immune system and anthropometric parameters in patients with NAFLD compared to subjects without NAFLD	85
2.1. Introduction	85
2.2. Objectives	86
2.3 Working hypothesis	86
2.4. Subjects and method	87
2.5. Results	89
2.6. Discussion	99
2.7. Conclusions	105
3. Study 3 – Digestive hormones, routine biological tests, RGC-32 and anthropometric parameters – possible predictors of liver steatosis	107
3.1. Introduction	107
3.2. Objectives	108
3.3. Working hypothesis	108
3.4. Subjects and method	109
3.5. Results	112
3.5.1. Characteristic features of patients with liver steatosis	112
3.5.2. Correlations between steatosis severity and anthropometric parameters	103
3.5.3. Correlations between steatosis severity, glycemic and lipid profiles and insulin resistance	115
3.5.4 Correlations between steatosis severity and digestive hormones	117
3.6. Discussion	119
3.7. Conclusions	124
4. General conclusions	127
5. Originality and novelty of the doctoral research	131
REFERENCES	135

Keywords : nonalcoholic fatty liver, digestive hormones, adipokines

INTRODUCTION

Obesity represents a major public health problem because of its high prevalence generated by unhealthy eating behaviors and increasingly sedentary lifestyle.

Liver steatosis is associated with metabolic risk factors such as obesity, insulin resistance (IR), dyslipidemia and arterial hypertension (AHT), all composing the metabolic syndrome (MS). Studies are still contradictory regarding the relation between NAFLD and cardiovascular events, but agree on the predictive role of NAFLD for the type 2 DM onset.

Dysfunctional adipose tissue is a strong predictor of cardiovascular diseases, type 2 DM, metabolic syndrome, and also of the NAFLD; it is postulated that anthropometric parameters could represent valuable indicators of hepatic necro-inflammatory activity. The disturbances of adipokines production by adipose tissue dysfunction and also digestive hormones (ghrelin and leptin) have been intensively studied, though their role in NAFLD and MS pathogenesis remains incompletely elucidated.

The importance of further research on adipokines and digestive hormones contribution to MS and NAFLD pathogenesis derives from the fact that recent studies have identified them as possible therapy targets. Adiponectin has a protective role in NAFLD pathogenesis, but the role of leptin remains unclear. Some researchers have evidenced a dual activity of leptin in NAFLD, initially antisteatotic, then proinflammatory and profibrotic, while other authors have found that leptin contributes to steatosis, inflammation and fibrosis. A dual activity has been evidenced also for ghrelin, initially pro-steatotic, then anti-inflammatory and antifibrotic. Fetuin A seems to play a role in NAFLD pathogenesis, but its part in liver fibrosis remains unknown. Another element in the NAFLD pathogenesis is the complement system, by its Response to gene complement-32 (RGC-32), though its relation with adipokines and digestive hormones is controversial, and so is the RGC-32 action in NAFLD pathogenesis.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Current knowledge on the research subject is covered by 4 chapters, which review the most important and updated information in literature regarding NAFLD.

The first chapter, Nonalcoholic Fatty Liver, the prevalent component of MS, includes the NAFLD definition, postulated hypotheses, pathophysiology of inflammation and dysfunctional adipose tissue in NAFLD. The chapter also explains the

relationship between MS elements in patients with NAFLD. It also includes recent data on the mechanisms of NAFLD progression to severe forms of NASH.

The contribution of ghrelin to NAFLD pathogenesis constitutes the second chapter of the Current state of knowledge. We attempted to explain the link between ghrelin and lipid and glycemic disturbances within NAFLD and also other pathophysiological mechanisms incriminated in NAFLD pathogenesis, such as the effects of ghrelin on inflammation, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue.

The 3rd chapter, Role of the immune system in NAFLD pathogenesis, includes recent data regarding the effects of the immune system on the hepatocyte metabolic dysfunction. We also tackled the effects of the complement system, its RGC-32 fraction, in NAFLD pathogenesis, and also the relation between the immune system and adipokines involved in liver cell dysfunction. At the same time, we analyzed recent studies on the relation between the immune system and ghrelin, and also dysfunctional adipose tissue, as elements of NAFLD etiopathogenesis.

The last chapter, Predictive scores of NAFLD and NASH, highlights the clinical and paraclinical importance of these asymptomatic conditions. The chapter is subdivided into two sub-chapters, the first on NAFLD predictive scores, some of them being in the clinical practice of fibrosis and liver cirrhosis assessment (such as steatotest), others in the course of being validated; the other sub-chapter includes scores that predict fibrosis within NAFLD. This chapter is of great clinical relevance, as it uses routine biological tests easily available to any clinician, which allow NAFLD diagnosis and onset of liver fibrosis, in order to make selection of patients requiring elaborate investigation as precise and accurate as possible, thus avoiding unnecessary costs.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. Relationship between serum levels of adipokines, digestive hormones and MS, the role of anthropometric parameters

Introduction. MS includes obesity, type 2 DM, glucose tolerance disturbance, alteration of lipid profile and cardiovascular abnormalities. A number of studies have also assessed adipokines behavior and their diagnostic value in the MS. Adiponectin, known for its beneficial effects, presents lower serum levels in patients with MS, while leptin has higher levels in the same patients. Recent studies have shown that, taken together, they have a higher diagnostic value than taken separately. Data in literature reveal contradicting results regarding the effects of ghrelin on the lipid profile, some studies showing a direct correlation, while others an inverse one. Fetuin A is in direct correlation with the elements of glycemic profile in MS, and also the dysmetabolic profile and serum triglycerides.

Working hypothesis / objectives. One of the study objectives has been to establish the serum levels of digestive hormones (ghrelin and leptin), adipokines (adiponectin) and hepatokines (fetuin A) in patients with MS, compared to subjects without MS. Another objective was to assess ghrelin, leptin, fetuin A and adiponectin levels in correlation with every MS element (AHT, DM2, obesity, high triglycerides, low HDL cholesterol). We also aimed to correlate obesity (anthropometric measurements) with RI elements and the dysmetabolic profile, as well as investigate adipokines and digestive hormones behavior in NAFLD fibrosis as assessed by fibromax.

Subjects and method. The study participants were recruited among the patients of “Prof. Dr. Octavian Fodor” Institute of Gastroenterology and Hepatology during March-December 2015. It was a prospective, analytical and observational study carried out on 60 patients, 20 with signs of MS and 40 without. All patients were evaluated based on a study record that included demographic, clinical and paraclinical data.

Results. Comparing the two groups (with and without MS) we evidenced the mean values of anthropometric parameters as being higher in the MS group, differences being statistically significant, p varying between 0.001 and 0.007. Though without statistical significance, leptin and fetuin A were higher in the MS group, while ghrelin and adiponectin were lower in the same group. Considering every MS element separately, we found that patients with DM2 presented higher serum levels of ghrelin, leptin, fetuin A, not statistically significant; adiponectin, on the other hand, was found statistically significantly lower in DM2 patients. According to the AHT element, higher levels of leptin, adiponectin, fetuin A were found in hypertensive patients, but lower ghrelin levels. Comparing obese and non-obese patients, ghrelin, leptin and fetuin A were higher in obese patients, but without statistical significance. We found statistical significance when analyzing the correlations between ghrelin and BMI, waist circumference, between leptin and waist and the percentage of adipose tissue, adiponectin and BMI, and the ratio between waist and adipose tissue, adiponectin and BMI, the ratio between waist and hip circumferences, and also between fetuin A and waist, and waist and hip respectively, with values of p between 0.002 și 0.078. Based on another MS element, triglycerides levels, we found that patients with high levels had high levels of ghrelin and fetuin A, lower for leptin. Adiponectin was lower in patients with high triglycerides, with statistical significance ($p=0.02$). Regarding hypoHDL cholesterol, patients had higher serum leptin and fetuin A levels, without statistical significance. On the other hand, lower ghrelin and adiponectin levels were found with statistical significance, p between 0.006 and 0.007. In correlation with fibrosis, as assessed by fibromax, we found a statistical significance for leptin – higher in subjects without fibrosis. Ghrelin and fetuin A were also higher in patients without fibrosis, while adiponectin was higher in patients with fibrosis.

Conclusions. These results evidence the complexity of the relationship between adipokines, hepatokines and digestive hormones in the metabolic syndrome, with each of its components, as well as with fibrosis engendered by NAFLD.

Study 2. Analysis of digestive hormones, immune system and anthropometric parameters in patients with NAFLD compared to subjects without NAFLD

Introduction. Liver steatosis represents a challenge for researchers in terms of prevention, diagnosis and treatment, given that it is a clinical condition without symptoms. Though it has a high prevalence, alternative diagnostic methods to liver biopsy have not been validate as yet. Recent studies have focused on the adipose tissue, considered to be the main element in NAFLD pathogenesis, responsible for adipokines production, among which leptin, investigated in our study. Ghrelin is a digestive hormone produced by the digestive mucosa, whose role in NAFLD pathogenesis remains to be established. Some studies have found it has a pro-steatotic effect, anti-inflammatory and antifibrotic respectively, while others disagree with this hypothesis. A growing interest has been recently given to the complement system, its RGC-32 component, with a role in cell proliferation, differentiation and fibrosis and also carcinogenesis. Rich-calorie diets increase RGC-32 levels in the adipose tissues. Experimental studies have evidenced a proinflammatory activity of RGC-32 in the vascular endothelium, while experimental RGC-32 deletion led to obesity regression, improved insulin activity and minimization of proinflammatory cytokines.

Working hypothesis / objectives. Taking into account the results of our first study, we considered important to assess digestive hormones in US-documented NAFLD. We also proposed to assess IR markers, RGC-32 complement fraction, and anthropometric parameters in patients with and without NAFLD.

Subjects and method. The patients were recruited from Medical Clinic 4 , Cluj-Napoca during April 2021 – May 2022. It is a prospective, analytical and observational study carried out on 77 patients, divided into 2 groups, with and without NAFLD. The control group was matched for gender and age \pm 2 years.

Results. Anthropometric measurements, i.e. BMI, abdominal, hip and thigh circumferences were higher in NAFLD patients, statistically significant differences and tendency to significance, p values between 0.000 and 0.084. Serum glycemia were comparable between the two groups, while IR (HOMA and insulinemia) were significantly higher in the steatosis group (p=0.000, and p=0.004 respectively). Regarding digestive hormones, we found that ghrelin was significantly lower in the NAFLD group (27.39 compared to 190.93), p=0.000, while leptin statistically significantly higher in the NAFLD group (77.11 vs. 48.32), p=0.004. Though we did not evidence a statistical significance for RGC-32 (p=0.510), we found lower serum levels in the NAFLD group compared to controls.

Conclusions. Anthropometric measurements and IR elements were increased in NAFLD patients compared to controls. Digestive hormones assessment indicated ghrelin to be lower and leptin higher in NAFLD. ELISA test for RGC-32 evidenced lower levels in NAFLD compared to controls, though experimental studies on RGC-32 found untoward effects in NAFLD.

Study 3. Digestive hormones, routine biological tests, RGC-32 and anthropometric parameters – possible predictors of liver steatosis

Introduction. NAFLD and its advanced form NASH have become the most common conditions worldwide. Untreated, it may progress to fibrosis and liver cirrhosis; the high prevalence of metabolic liver cirrhosis (30-40%) is worrying, as it has become the second reason for liver transplantation. Studies on the activity of leptin in relation to NAFLD and NASH are conflicting. Some studies have found that in the early stages leptin has antisteatotic effects, while at advanced stages it promotes inflammation and fibrosis. Other studies have found that leptin has pro-steatotic properties. On the other hand, ghrelin has pro-steatotic effects at first, and later anti-inflammatory and antifibrotic. Another element involved in metabolic liver disease is the complement system, its RGC-32 fraction. Experimental murine studies have shown it induces inflammation and liver steatosis, its deletion entailing a regression of liver injuries in NAFLD.

Objectives / working hypothesis. One of the objectives of this study was to investigate a correlation between the severity of liver steatosis evidenced by US and the clinical / paraclinical data in patients with NAFLD. We also proposed to assess the relation between the severity of liver steatosis and digestive hormones, IR and RGC-32 respectively.

Subjects and method. The study patients were recruited from Medical Clinic IV Cluj-Napoca during April 2021 – May 2022. It was an analytical, observational prospective study carried out on 55 patients. They were divided into 3 groups according to steatosis severity as documented by US: group 1 – 36 patients with mild steatosis; group 2 – 16 patients with moderate steatosis; and group 3 – 8 patients with severe steatosis. The three groups were compared regarding anthropometric measurements, glycemic profiles, IR, digestive hormones and RGC-32.

Results. Anthropometric parameters were directly correlated with the steatosis severity (BMI, waist and hip circumference), reaching statistical significance (p was 0.01, 0.003, and 0.01 respectively). Regarding sugar metabolism, we found a tendency to statistical significance of glycemia values, i.e. higher in mild steatosis, with insulin levels higher also. Though not always significant, dietary hormones, ghrelin and leptin were higher in patients with severe steatosis. RGC-32 complement fraction was increased in patients with mild steatosis compared to those with severe steatosis.

Conclusions. Our study evidenced a direct correlation between anthropometric measurements and the severity of US-documented steatosis. The analysis of the glycemic profile and IR revealed an inverse correlation. Digestive hormones were directly correlated with steatosis severity, while serum RGC-32 was negatively correlated with this condition.

Originality and novelty of the doctoral research

This research describes the variations of adipokines and digestive hormones in relation to MS and especially its main component NAFLD. Futhering the study of these elements, together with anthropometric parameters in MS and NAFLD pathogenesis could help create a set of scores to be used in the diagnosis and treatment of these conditions since early stages, given that most of the elements of MS and NAFLD are clinically silent.

This dissertation has emphasized again the importance of the clinical elements that underlie the assessment of cutaneous and visceral adipose tissues, which play a role in NAFLD and MS pathogenesis. We found negative correlations of ghrelin and adiponectine with obesity, while leptin presented positive correlations with the same. Anthropometric measurements are inexpensive and readily available for any clinician, regardless of specialty, therefore we consider them useful to be integrated in the calculation of scores for the diagnosis of MS and NAFLD at early stages.

The analysis of digestive hormones in correlation with NAFLD indicated lower ghrelin and higher leptin levels in steatosis. We consider that both hormones could be useful tools in the selection of patients that would require costly tests such as fibromax, liver elastography, MRI or liver biopsy. Also the variations of digestive hormones draw the attention on the inadequate dietary behaviors that trigger such silent disease. Another important element of this dissertation was the assessment of the immune component in NAFLD pathogenesis, by measuring serum RGC-32, found higher in liver steatosis. To our knowledge RGC-32 dosage has not been investigated in liver diseases. These findings point to NAFLD as a chronic metabolic condition with a possible immune component.

The last part of the dissertation found directly proportional increases of the clinical elements of obesity and digestive hormones with liver steatosis severity. Regarding the complement fraction, it was inversely correlated with steatosis severity.

The dissertation proposed a wider approach of NAFLD and MS, starting from the clinical diagnostic elements, digestive hormones assessment, going to novel diagnostic methods, such as RGC-32 fraction of the complement system. We also proposed new hypotheses for research that would lead to new diagnostic methods of NAFLD at early stages, thus limiting the progression to fibrosis, all of this taking into account the worrisome epidemiological data on the causes of liver transplantation.