

APPROFONDIMENTI FISIOPATOLOGICI

SINDROME METABOLICA E STEATOSI EPATICA: RAPPORTI, MECCANISMI E DETERMINANTI

FRANCESCA DI VECE, EDOARDO DALLA NORA, ANGELINA PASSARO,
LUCA TESTONI, GIOVANNI B. VIGNA

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Medicina Interna,
Gerontologia e Nutrizione Clinica, Università degli Studi di Ferrara*

SOMMARIO

La steatosi epatica non alcolica (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD), comprende una varietà di quadri istologici che vanno dalla steatosi semplice alla steatoepatite, fino alla cirrosi. Dati clinici e sperimentali fanno ritenere la NAFLD una manifestazione epatica della sindrome metabolica (SM). L'associazione tra SM e NAFLD è per lo più di tipo epidemiologico, ma anche dal punto di vista patogenetico queste due condizioni sembrano condividere numerosi aspetti tra cui, più rilevante, l'insulino-resistenza (IR). Quest'ultima è modulata da mediatori rilasciati da cellule immunitarie e dagli adipociti, e particolarmente significativo appare il ruolo di citochine come il TNF- α . All'opposto l'adiponectina è un potente inibitore del TNF- α , e studi in vitro e nell'animale hanno documentato l'importanza di questa adipochina nel contrastare infiammazione, insulino-resistenza sistemica ed epatica e il conseguente sviluppo di NAFLD. Fattori genetici (il cui ruolo si inizia solo oggi ad intravedere, in particolare per quanto riguarda il gene PNPLA3), citochine, dieta, insulino-resistenza, stress ossidativo e stress del reticolo endoplasmico, microflora intestinale e immunità costitutiva concorrono, secondo una modalità complessa, a definire "colpi multipli paralleli" che agiscono in modo convergente a livello dell'epatocita e ne inducono il danno. La NAFLD, e in particolare la steatoepatite, si associa ad un aumentato rischio di morte per tutte le cause; sono ormai numerosi i dati in letteratura che inducono a considerarla un fattore di rischio per malattia cardiovascolare indipendente da età, sesso, fumo, colesterolemia e i restanti componenti della SM. Le strategie terapeutiche non sono ancora chiaramente definite, ma la modificazione dello stile di vita (dieta, esercizio fisico e calo ponderale) determinano un miglioramento dell'insulino-resistenza, della SM eventualmente presente e del quadro clinico ed istologico epatico.

Parole chiave: sindrome metabolica, steatosi epatica, steatoepatite, infiammazione, rischio cardiovascolare, determinanti genetici.

Introduzione

La steatosi epatica non alcolica (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) e la sindrome metabolica (SM) sono entità eterogenee accomunate dalla condivisione di aspetti clinici e fisiopatologici.

Numerose società scientifiche, nel corso degli anni, hanno elaborato schemi dia-

Indirizzo per la corrispondenza

Dott. Giovanni B. Vigna
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Sezione di Medicina Interna,
Gerontologia e Nutrizione Clinica
Università degli Studi
Via Savonarola, 9 - 44100 Ferrara
E-mail: vgg@unife.it

gnostici diversi per codificare la presenza di SM: l'obesità viscerale e l'insulino resistenza (IR), insieme a ridotta tolleranza glucidica/iperglicemia, ipertensione arteriosa e dislipidemia aterogena (ipertrigliceridemia con bassi livelli di colesterolo-HDL e incremento delle LDL piccole e dense) (1), rappresentano il cardine della sindrome metabolica che tuttavia riconosce come elemento caratterizzante e lesivo, uno stato pro-infiammatorio e protrombotico (2) a genesi complessa (citochine di derivazione locale-vascolare e sistemica, epatica e dal tessuto adiposo). Proprio per questi elementi la SM favorisce un sensibile incremento del rischio di eventi cardiovascolari e di sviluppare diabete (3), mentre il suo riconoscimento consente di avviare precocemente questi soggetti ad un trattamento comportamentale e/o farmacologico volto a contrastarne le complicanze.

La steatosi epatica è definita dal punto di vista anatomico-patologico come un accumulo di lipidi nel fegato superiore al 5-10% del peso dell'organo o dalla presenza di goccioline lipidiche in più del 5% degli epatociti (4). Si definisce NAFLD una condizione di steatosi in assenza di evidenza clinica/anamnestica di abuso di alcol etilico o di altra causa nota di danno epatico. Riconosciuta da molti anni e a lungo considerata patologia benigna e di riscontro casuale, la NAFLD ha suscitato crescente interesse per la sua prevalenza in aumento, per i meccanismi fisiopatologici, per le condizioni ad essa correlate e per il riconoscimento dei rischi legati alla sua evoluzione clinica.

Sia la SM che la NAFLD sono disturbi metabolici di notevole rilevanza clinica con importanti implicazioni di tipo sanitario e sociale. La SM, infatti, interessa circa il 20-30% della popolazione generale e quasi la metà degli individui anziani; sog-

getti di origine ispanica e provenienti dal subcontinente indiano appaiono particolarmente suscettibili a tale condizione (5). La NAFLD, data anche l'elevata frequenza con cui soggetti asintomatici eseguono test ematici ed indagini ecografiche, ha raggiunto attualmente una prevalenza di proporzioni epidemiche ed è considerata una delle cause più comuni di malattia epatica cronica nei paesi occidentali (6-8): si stima che in essi il 20-30% della popolazione adulta ne sia affetto e che questa percentuale cresca fino al 70-90% tra coloro che sono obesi o diabetici. La NAFLD sembra essere egualmente rappresentata nei due sessi, ma secondo alcuni autori vi sarebbe una predilezione per quello maschile (9); esisterebbe anche una differente distribuzione tra gruppi etnici, con possibile prevalenza in soggetti asiatici (10). Essa riconosce frequentemente una associazione con obesità, soprattutto addominale, diabete e dislipidemia ed è correlata intimamente all'incremento di vari marcatori clinici e biologici di insulino-resistenza. Potrebbe dunque rientrare tra le manifestazioni cliniche della SM (11): circa il 90% dei pazienti con NAFLD presenta almeno un fattore di rischio della SM, mentre nel 33% dei casi sono presenti tutte le caratteristiche della sindrome.

La NAFLD è fondamentalmente associata a (12-14):

- obesità o sovrappeso, nel 70% dei casi;
- diabete mellito tipo 2 o ridotta tolleranza al glucosio, nel 10% dei casi (altri studi mostrano prevalenze più alte, tra il 28 e il 55%);
- dislipidemia, nel 20-60% dei casi;
- ipertensione, nel 36-70% dei casi.

Un recente studio multicentrico promosso dalla Società Italiana per lo Studio dell'Arteriosclerosi (SISA) ha documentato una prevalenza ultrasonografica di

NAFLD del 78% tra 203 soggetti affetti da SM; adiposità viscerale, insulino-resistenza e rapporto trigliceridemia/C-HDL sono risultati tutti parametri predittivi indipendenti del grado di steatosi (15).

Steatosi e steatoepatite

Nel 1980 J. Ludwig introdusse il termine di steatoepatite non alcolica (NASH) per definire una sindrome clinico-patologica riscontrata in 20 pazienti adulti della Mayo Clinic; in essi la biopsia epatica mostrava un pattern caratteristico dell'epatopatia alcolica in assenza di evidenza anamnestica o clinica di abuso di etanolo o di altra causa nota di danno epatico (16). Da allora molti termini sono stati utilizzati per definire questa entità, riflettendo ora le lesioni istologiche primarie, ora una ipotizzata eziologia; tra essi ricordiamo quelli di epatite steatosica, malattia di Laennec non alcolica, epatite diabetica, malattia epatica simil-alcolica e, come detto, steatoepatite non alcolica; il termine "NAFLD" è diventato la dizione preferita. Esso fa riferimento ad un ampio spettro di danno epatico che va dalla semplice steatosi, alla steatosi con elementi infiammatori (NASH), alla fibrosi più o meno avanzata fino alla cirrosi. La definizione più recente di NASH indica, dunque, solo uno stadio possibile di malattia.

La storia naturale della NAFLD è ancora fonte di numerosi dubbi per la mancanza di studi prospettici a lungo termine, e non è chiaro come mai in alcuni pazienti vi sia una progressione della malattia dall'infiammazione fino alla fibrosi e alla cirrosi e in altri, invece, la malattia rimanga limitata ad uno stadio di steatosi semplice. La percentuale di pazienti con NAFLD, che sviluppa steatoepatite (NASH) è stimata intorno al 20-30% e di questi circa il 20% evolverà in cirrosi, e il 30-40% andrà incontro a morte

per malattia epatica. È dunque importante definire non solo i meccanismi che contribuiscono allo sviluppo di steatosi, ma anche quelli che sono causa di steatoepatite. L'analisi retrospettiva dei dati di un ampio studio condotto nella contea di Olmsted (Minnesota) in 420 pazienti con NAFLD seguiti per 7,6 anni, ha messo in evidenza alcuni aspetti interessanti: una percentuale pari al 3% dei pazienti è andata incontro a cirrosi; prima causa di morte sono risultate le malattie cardiovascolari e terza causa le malattie epatiche, nessuno dei pazienti inizialmente riconosciuto affetto solo da blanda steatosi (in assenza di fibrosi) è andato incontro a cirrosi o ad altre complicanze epatiche (17). Questo ed altri studi confermerebbero l'ipotesi di una prognosi favorevole della steatosi semplice, ma alcuni autori hanno evidenziato nei pazienti con NAFLD e in quelli con NASH (18) livelli analoghi di alcuni marcatori infiammatori (come il fattore di crescita tumorale 1-beta, TGF1- β): è verosimile che queste due condizioni condividano elementi fisiopatologici ed una storia naturale comune. D'altra parte risulta difficile prevedere la progressione attraverso i diversi stadi di malattia; ne deriva una crescente preoccupazione in rapporto alla comparsa in letteratura di casi di epatocarcinoma in assenza di cirrosi.

A tale riguardo un piccolo studio retrospettivo ha analizzato 50 pazienti con biopsia positiva per neoplasia epatica: in tre di questi l'esame istologico documentava solo blanda steatosi in assenza di fibrosi e cirrosi; non risultava evidenza anamnestica di malattia epatica cronica mentre erano presenti in tutti i casi segni/sintomi di SM (19). Non essendo definitivamente chiarito se l'associazione tra sindrome metabolica e NAFLD sia di tipo causale, appare ulteriormente necessario chiarire tale rapporto che, se eziologico, potrebbe far rivalutare la tipologia di pazienti da sot-

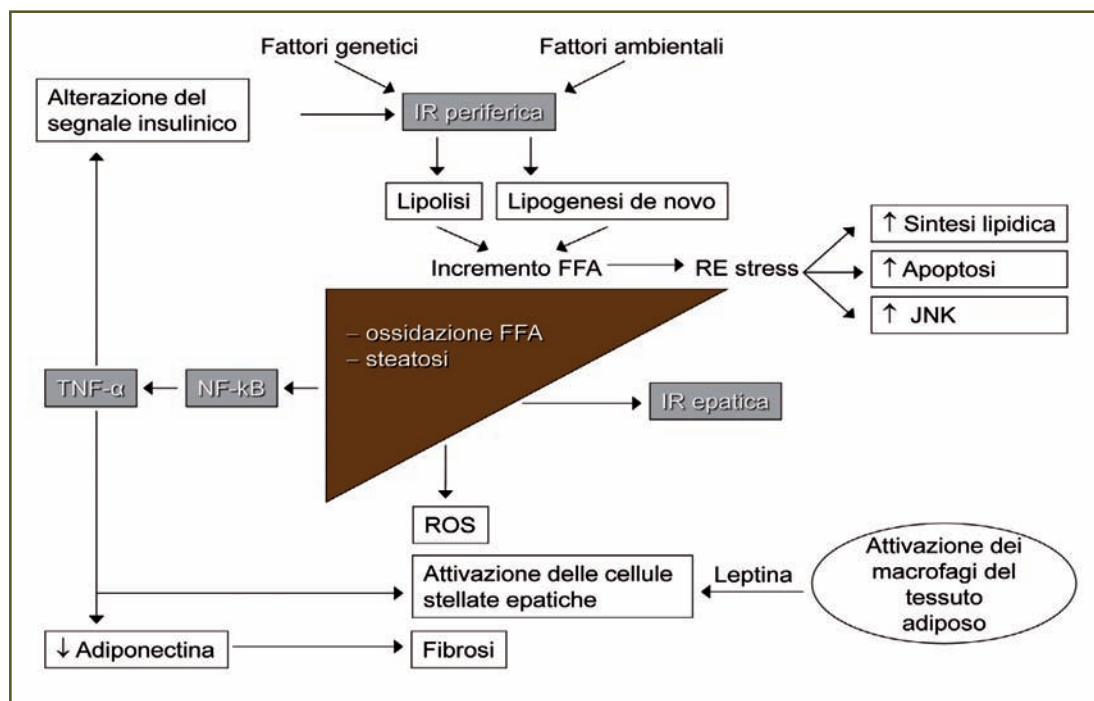


Figura 1 - Patogenesi della NAFLD.

La resistenza insulinica periferica (IR) favorisce un'accresciuta produzione di ac. grassi liberi (FFA) diretta al fegato, determinando un disequilibrio tra ossidazione/dismissione e uptake/sintesi di FFA, e quindi steatosi epatica. La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte del metabolismo ossidativo degli FFA causa apoptosi e innesca un danno infiammatorio con attivazione delle cellule stellate che inducono fibrosi epatica. L'incremento epatico degli FFA determina anche stress del reticolo-endoplasmatico (RE), infiammazione epatocitaria e apoptosi tramite l'attivazione della chinasi c-Jun N-terminale (JNK). Il tessuto adiposo secerne adipochine come la leptina, capace di regolare il metabolismo adipocitario e numerosi processi insulinomediati. L'adiponectina riveste un ruolo anti-infiammatorio e anti-steatotico; la sua secrezione è in parte regolata dal TNF- α sotto il controllo di NF- κ B.

toporre a screening per carcinoma epatico (19).

I meccanismi fisiopatologici e i processi cellulari studiati per definire la patogenesi della NAFLD sono numerosi e comprendono insulino-resistenza, stress-ossidativo, attivazione delle cellule stellate, apoptosi, infiammazione e fattori genetici (*Figura 1*).

L'obesità, uno degli elementi chiave nella definizione di sindrome metabolica è considerata un predittore indipendente di fibrosi epatica avanzata. Colicchio et al. in uno studio condotto su 187 pazienti

obesi non diabetici, hanno riscontrato un grado severo di steatosi in tutti i pazienti con obesità di grado III (Body Mass Index, BMI >40 kg/m²) (20). Il grado di adiposità centrale sembra correlare con la NAFLD indipendentemente dal grado di obesità espresso tramite BMI, sottolineando il ruolo secondario del tessuto adiposo periferico (sottocutaneo) rispetto a quello viscerale (21). Tanto la SM come la NAFLD mostrano come fattori condizionanti la loro evoluzione, la comparsa di iperinsulinemia e l'innescarsi di processi infiammatori, i quali, cronicizzando, possono aumentare negli

individui malati il rischio di essere interessati da una parte da malattie cardiovascolari e diabete mellito, dall'altra da cirrosi epatica e epatocarcinoma. Mentre i fattori di rischio di NAFLD sembrano chiarirsi, i meccanismi fisiopatologici sottostanti rappresentano ancora un argomento dibattuto e in buona parte oscuro.

I determinanti genetici

L'osservazione di differenze nella prevalenza, manifestazioni cliniche e alterazioni istopatologiche della NAFLD, come riscontrata in soggetti appartenenti a gruppi etnici diversi, ha indirizzato la ricerca verso l'identificazione di possibili determinanti genetici responsabili. Sono stati indagati numerosi geni, particolarmente quelli coinvolti in importanti vie del metabolismo lipidico, glucidico e dello stress ossidativo. Tra i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) maggiormente studiati vi sono quelli del gene dell'apolipoproteina C3 (APOC3) e di adiponutrina (PNPLA3).

L'Apolipoproteina C3 è codificata da un gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 11 (APOC3) ed esercita un ruolo importante nel metabolismo dei lipidi (inibisce la Lipasi Lipoproteica endoteliale e dunque il catabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi). Gli SNP C482T e T455C a livello del promoter di questo gene sono stati associati ad un'aumentata incidenza di SM e patologie cardiovascolari ma anche a insulino-resistenza e comparsa di NAFLD (22). Altri studi non hanno invece confermato tale associazione (23, 24), sottolineandone invece un'altra più costante e significativa con PNPLA3 (25, 26). Quest'ultimo gene (con sede nel braccio lungo del cromosoma 22) codifica una proteina nota come

adiponutrina o 'patatin-like phospholipase domain-containing protein 3', che rappresenta un enzima multifunzionale associato alla membrana cellulare con attività di lipasi trigliceridica o acil-transferasi, e la cui funzione, ancora incompletamente caratterizzata, appare modulata dall'insulina. In un ampio studio di associazione genomica (Dallas Heart Study) una comune variante di tale proteina (I148M, dovuta ad una variazione da citosina a guanina e sostituzione da isoleucina a metionina a carico del codon 148), particolarmente diffusa nella comunità ispanica, si è rivelata un determinante maggiore del contenuto epatico di trigliceridi e della flogosi epatica, in maniera indipendente da obesità, diabete ed utilizzo di etanolo (27). Una recente metanalisi ha confermato che il polimorfismo I148M si associa non solo con il grado di steatosi (gli omozigoti per l'allele variante G mostravano un incremento del 73% dei trigliceridi epatici) ma anche con la suscettibilità ad una malattia più aggressiva (un rischio maggiore di 3,2 volte di manifestare un più elevato punteggio necroinfiammatorio e di sviluppare fibrosi tra i soggetti con l'allele G) (28) in modo indipendente dal gruppo etnico e dai parametri antropometrici (29).

L'importanza di identificare determinanti genici significativi appare evidente e potrebbe in futuro consentire di riconoscere precocemente pazienti a rischio di sviluppare malattia evolutiva verso cui indirizzare maggiori sforzi terapeutici.

Rischio cardiovascolare e steatosi epatica

La *Tabella 1* riporta alcuni tra gli studi prospettici e retrospettivi più importanti che evidenziano una correlazione tra NAFLD e malattia cardiovascolare (30).

I dati non sono tutti concordi, ma una meta-analisi sistematica di sette studi per un totale di 3.497 pazienti ha confermato l'associazione esistente tra steatosi epatica diagnosticata all'ecografia e aumento dello

spessore intima-media a livello carotideo (marker di aterosclerosi subclinica) indipendentemente dalla presenza di obesità e altri fattori di rischio cardiovascolare noti (31). In un ampio studio di circa 3.000 pa-

Tabella I - Principali studi prospettici di associazione tra NAFLD e incidenza di eventi cardiovascolari maggiori [da 30]*.

Autori	Popolazione studiata	Età	Follow-up (anni)	Obiettivi	Risultati principali
Hamaguchi et al.	Coorte di 1637 soggetti sani in Giappone	22-83	5	Coronaropatia non fatale, ictus ischemici e non	Aumento del rischio di eventi CVD non fatali associati con NAFLD indipendentemente da età, sesso, BMI, fumo, consumo di alcolici, pressione arteriosa, LDL colesterolo, trigliceridi e HDL colesterolo
Targher et al.	Studio caso-controllo inserito in una coorte di pazienti ambulatoriali con diabete tipo 2 in Italia; 248 pazienti e 496 controlli suddivisi per età e sesso, senza storia di CVD o di epatite virale al baseline	40-79	5	Morte per CVD e infarto miocardico non fatale, ictus ischemico e procedure di rivascolarizzazione	Aumento del rischio di eventi CVD fatali e non fatali associati a NAFLD indipendentemente da età, sesso, BMI, circonferenza vita, fumo, utilizzo di farmaci (ipolipemizzanti, ipoglicemizzanti, antipertensivi e antiaggreganti piastrinici), consumo di alcolici, durata del diabete e valori di pressione arteriosa, emoglobina glicata, LDL colesterolo, trigliceridi, HDL colesterolo e GGT.
Targher et al.	Valpolicella Heart Diabetes Study: coorte di 2103 pazienti ambulatoriali con diabete tipo 2 in Italia senza storia di CVD o di epatite virale al baseline	40-79	6,5	Morte per CVD e infarto miocardico non fatale, ictus ischemico e procedure di rivascolarizzazione	Aumento del rischio di eventi CVD fatali e non fatali associati a NAFLD indipendentemente da età, sesso, BMI, circonferenza vita, fumo, utilizzo di farmaci, consumo di alcolici, pressione arteriosa, durata del diabete, emoglobina glicata, LDL colesterolo, trigliceridi, HDL colesterolo e GGT.
Haring et al.	Study of Health in Pomerania: studio di popolazione di 4160 uomini e donne in Germania senza storia di epatite virale o cirrosi al baseline	20-79	7,3	Morte per tutte le cause e morte per CVD	Aumento del rischio di morte per tutte le cause e di morte da CVD tra gli uomini con NAFLD indipendentemente da età, sesso, circonferenza vita, consumo di alcolici, attività fisica, scolarità, stato civile (vive da solo vs vive col partner), pressione arteriosa, diabete, indice delle attività funzionali di Groll.

*NAFLD è stata diagnosticata sulla base di reperti ultrasonografici in tutti gli studi, con una eccezione: nello "Study of Health in Pomerania", NAFLD è stata diagnosticata sulla base di reperti ultrasonografici e/o di elevati livelli di γ -glutamilttransferasi (GGT). BMI: indice di massa corporea. CVD: malattie cardiovascolari. HDL: lipoproteine ad alta densità. LDL: lipoproteine a bassa densità.

zienti affetti da diabete di tipo 2, il rischio di malattia aterosclerotica è risultato essere significativamente più elevato nei pazienti affetti da NAFLD, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio cardiovascolare e dalla durata e gravità del diabete (32). Risultati simili sono stati trovati anche in uno studio condotto su pazienti con diabete di tipo 1 (33).

Il meccanismo fisiopatologico proposto considera il fegato al centro di un circolo vizioso che lo vede nel contempo bersaglio e fonte di fattori proaterogeni e proinfiammatori (*Figura 2*). L'incremento dell'idrolisi di trigliceridi adipocitari (e consensualmente del livello di acidi grassi liberi circolanti, FFA, a loro volta fattori responsabili di resistenza insulinica), della lipogenesi e della concentrazione dei chilomicroni dietetici in corso di insulino-resistenza, sono responsabili di accumulo

di trigliceridi epatici (34, 35). Alcuni studi hanno mostrato, inoltre, come nei pazienti con NAFLD vi sia una iperespressione di alcuni geni coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi, nella lipolisi, nel reclutamento dei macrofagi e dei monociti, nella coagulazione e nell'infiammazione. È stato osservato, in particolare, che i livelli circolanti di fattori pro-coagulanti (PAI-1, fibrinogeno, fattore VII), markers di stress ossidativo (nitrotirosina, LDL ossidate) ed infiammatori, risultavano più elevati nei pazienti con NASH ed intermedi in quelli con steatosi semplice rispetto ai soggetti privi di steatosi e che tale differenza era indipendente dall'estensione del tessuto adiposo viscerale e da altri possibili fattori confondenti (36). Nel fegato di pazienti con NAFLD si è osservata, in particolare, l'attivazione di fattori di trascrizione intracellulare, come il fattore nucleare kB

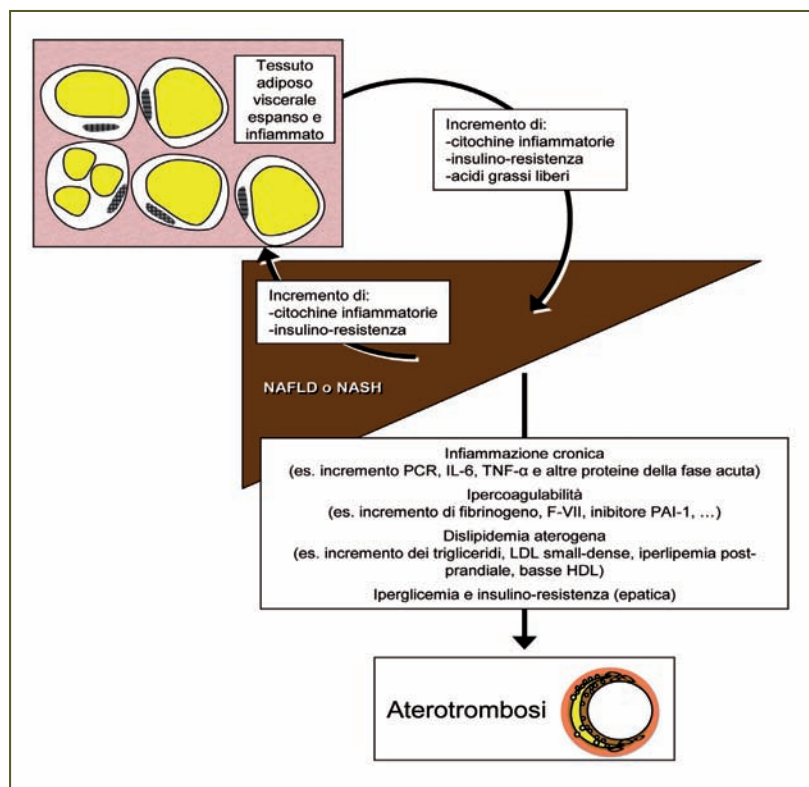


Figura 2

Meccanismo fisiopatologico alla base della correlazione tra NAFLD e rischio cardiovascolare.

(NF- κ B), in grado di aumentare la trascrizione di geni responsabili del mantenimento di uno stato infiammatorio cronico di basso grado quali interleuchina 6 (IL-6), proteina C reattiva (PCR) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), prodotti sia dagli epatociti sia dalle cellule stellate e del Kupffer.

Stato pro-infiammatorio

Riconosciuto clinicamente dall'elevazione della Proteina C reattiva (PCR), lo stato pro-infiammatorio accompagna spesso i pazienti affetti da SM e steatosi epatica. Molteplici meccanismi, tra cui l'adiposità viscerale, possono spiegare l'aumento della PCR. Il tessuto adiposo viscerale favorisce l'aumento di FFA e rilascia citochine infiammatorie, principali responsabili dell'incremento della PCR di produzione epatica. Attualmente si ritiene che lo stato pro-infiammatorio rappresenti un comune denominatore tra sviluppo di insulino-resistenza, aterogenesi ed evoluzione della steatosi epatica (37).

Interleuchina 6 e TNF- α sono due tra le principali citochine capaci di determinare e mantenere uno stato infiammatorio cronico. Prodotte entrambe dai macrofagi, ma secrete anche dal tessuto adiposo e dal fegato, sono in grado di inibire la tirosin-chinasi del recettore insulinico, indurre insulino-resistenza e la conseguente stimolazione della lipogenesi, favorendo la comparsa di steatosi epatica (38). Il TNF- α è inoltre responsabile di danno epatocellulare mediante l'inibizione del trasporto degli elettroni a livello della catena respiratoria mitocondriale e il conseguente rilascio di specie reattive dell'ossigeno con attivazione della perossidazione lipidica (39) ed è stato evidenziato, perlomeno nell'animale da esperimento, che la sua neutralizzazio-

ne migliora insulino-resistenza, steatosi e flogosi epatica (40).

Leptina e adiponectina sono sostanze ad azione ormonale coinvolte nel mantenimento dello stato infiammatorio. La prima è un fattore coinvolto nella regolazione dell'appetito ed è prodotta nel tessuto adiposo (insieme ad adiponectina e TNF- α); potrebbe svolgere un ruolo importante nel modulare l'accumulo di trigliceridi in fegato, cuore e muscolo. Normalmente ostacola l'accumulo di trigliceridi a livello epatico, ma nei pazienti con NAFLD, sia obesi che normopeso, sono stati riscontrati elevati livelli di leptina, in possibile relazione ad una resistenza alla leptina analoga a quella insulinica; ciò favorirebbe il deposito di trigliceridi nel fegato e l'insorgenza di steatosi epatica. L'adiponectina mostra una concentrazione ridotta in presenza di insulino-resistenza/obesità, ed è un modulatore della sensibilità all'insulina. Riveste un ruolo protettivo nei confronti dell'insorgenza della NAFLD tramite inibizione della produzione epatica di TNF- α e quella di citochine (IL-6) da parte del tessuto adiposo (sostanze coinvolte nel processo infiammatorio sistemico) (41). Inoltre l'adiponectina presenta potenzialità normalizzanti il metabolismo glucidico e antiaterogene, mentre bassi livelli appaiono correlati alla presenza di malattia cardiovascolare e ad un aumentato rischio di sviluppare diabete mellito.

Evoluzione dell'infiammazione nella NAFLD: nuove ipotesi fisiopatologiche e ruolo nell'ambito del rischio cardiovascolare

L'osservazione che non tutti i pazienti con steatosi sviluppano infiammazione e danno epatocellulare ha portato Day et al. ad ipotizzare che fattori diversi conduca-

no alla steatosi epatica e quindi al danno d'organo (steatoepatite) (42). Gli autori hanno teorizzato un processo a due "colpi": l'accumulo di trigliceridi nel fegato è fortemente in rapporto alla presenza di insulino-resistenza, la quale rivestirebbe un ruolo primario nell'innescare effetti che conducono alla successiva comparsa di steatosi epatica; in seguito meccanismi responsabili di stress ossidativo (con aumento delle sostanze reattive dell'ossigeno, ROS - reactive oxygen species, riduzione degli agenti antiossidanti e facilitazione della perossidazione lipidica) indurrebbero lo sviluppo di NASH. Molteplici fattori sono stati coinvolti nello sviluppo del danno epatico in questa fase di stress ossidativo: oltre ad alterazioni mitocondriali sono stati considerati la presenza di un disturbo endocrino che interessa leptina, adiponectina, TNF- α e altre sostanze flogogene che favoriscono e perpetuano gli eventi che conducono a infiammazione, fibrosi e apoptosi e determinano la comparsa tardiva di cirrosi (43). Negli epatociti dei pazienti con steatosi si è anche osservata una riduzione di acidi grassi polinsaturi in particolare di quelli della serie omega-3 (n-3 PUFAs), possibile concausa di danno cellulare (7). Studi su modelli animali (successivamente confermati anche nell'uomo) hanno infatti evidenziato un effetto protettivo dei PUFA, capaci di svolgere un'azione antinfiammatoria e ridurre lipogenesi e accumulo di grasso a livello viscerale (44). Gli FFA invece, presenti in eccesso sono in grado di favorire apoptosi cellulare attraverso diversi meccanismi (*Figura 1*): vie di segnale lisosomiali, recettori di membrana e apoptosi mediata dalla chinasi c-Jun N-terminale (JNK) (45). Gli epatociti steatosici inoltre sono maggiormente vulnerabili all'apoptosi indotta da acidi biliari in rapporto ad una aumentata attivazione

delle caspasi 3 e 7 e della trascrizione di IL-8 e IL-22 (46).

In questo modello i due meccanismi sopra descritti, insulino-resistenza (con sviluppo di steatosi) e danno epatocellulare, non risultano necessariamente disgiunti temporalmente, ma possono riconoscere un unico momento patogenetico (13), ed è verosimile che l'insulino-resistenza rappresenti la chiave d'innescamento e il punto di contatto tra sindrome metabolica, obesità, dislipidemia da una parte e NAFLD dall'altra.

Recentemente Tilg e Moschen hanno rivisto tale ricostruzione patogenetica, considerando la NASH come distinta dalla steatosi epatica semplice e non una evoluzione di quest'ultima. Tali Autori hanno proposto un nuovo modello in cui molteplici fattori causali agendo simultaneamente, sono in grado di determinare la comparsa di malattia epatica (modello "a colpi multipli paralleli") (47, 48). Secondo questa nuova interpretazione steatoepatite e steatosi rappresentano due entità nosologiche distinte; addirittura l'infiammazione, intesa come risposta dell'epatocita allo stress causato da fattori ambientali e genetici diversi, può precedere la comparsa di steatosi in corso di NASH e ad essa condurre. Osservazioni di pazienti con NASH in cui la steatosi è pressoché assente tendono a confermare tale ipotesi (49), così come il riscontro in modelli animali (topi con fenotipo obeso ob/ob) di regressione della steatosi dopo terapia antinfiammatoria con anticorpi monoclonali anti TNF- α , o con metformina (anch'essa capace di ridurre l'espressione di TNF- α) (40). L'ipotesi di Tilg e Moschen sottolinea un ruolo patogenetico preminente svolto da diversi fattori di derivazione extraepatica (in particolare intestino e tessuto adiposo) nel determinare flogosi e fibrosi epatica, sottolineando il possibile ruolo patogenetico delle alterazioni stress-correlate del reticolo endopla-

smatico. Le modificazioni della microflora intestinale, secondarie a dieta ricca di grassi/carboidrati o ad una alterazione del sistema immunitario può favorire la comparsa di uno stato pro-infiammatorio, peggiorare il livello di adiposità viscerale e indurre insulino-resistenza e steatosi epatica (50). Aumento in circolo di endotossine batteriche (in rapporto ad una alterata funzionalità di sequestro epatico), ridotta sintesi di acidi grassi a catena corta (in grado di svolgere una azione anti-infiammatoria) (51), alterata espressione a livello dell'epitelio intestinale di recettori toll-like (TLR) (regolatori dell'infiammazione e coinvolti nell'immunità innata) (52) possono rappresentare dei "mediatori molecolari" di danno epatico, inducendo accumulo lipidico a livello epatico, lipotossicità, fibrosi e, infine, l'insorgenza di neoplasie. Nel modello "a colpi multipli paralleli" viene sottolineato anche il possibile ruolo di fattori genetici, come i polimorfismi di alcune fosfolipasi, che sono stati associati ad una accelerazione della progressione del danno epatico in alcuni individui (47).

In entrambi i modelli patogenetici proposti lo stato pro-infiammatorio svolge una azione centrale: può essere il risultato di vie metaboliche differenti e rappresentare il substrato comune per l'insorgenza di insulino-resistenza, steatosi epatica e rischio cardiovascolare correlato; potrebbe anche rappresentare il target di nuove strategie terapeutiche. La vitamina E, ad esempio, è in grado di ridurre le concentrazioni di alcune citochine pro-infiammatorie e di aumentare quella di adiponectina; sembra possa influenzare positivamente la steatoepatite presente pur senza influire sullo stato di insulino-resistenza (53).

Numerose evidenze sperimentali documentano come la steatoepatite svolga un ruolo aterogeno indipendente dal livello di adiposità viscerale e dalla presenza di altri

dismetabolismi. Così il rischio cardiovascolare appare maggiore tra i pazienti con NASH rispetto a quelli con semplice steatosi e risulta strettamente correlato con i livelli plasmatici di transaminasi (marker della necroinfiammazione epatica) (54).

NAFLD e NASH, inoltre, aggravando lo stato di insulino-resistenza epatica, contribuiscono alla comparsa della cosiddetta dislipidemia aterogena (ipertrigliceridemia, bassi livelli di HDL, presenza di LDL piccole e dense) (35), fattore di rischio cardiovascolare ormai bene documentato. Sebbene siano necessari ulteriori conferme, le osservazioni disponibili mettono in evidenza come NAFLD e NASH non rappresentino solo un marker di rischio cardiovascolare, ma risultino fattori eziopatogenetici direttamente coinvolti. Non è noto se il miglioramento di steatosi/steatoepatite si traduca in un rallentamento nella sviluppo e progressione di malattie cardiovascolari, ma è possibile affermare che i pazienti con diagnosi di NAFLD/NASH sono candidati ad un trattamento precoce ed aggressivo dei principali fattori di rischio cardiovascolare e della SM, in quanto la mortalità correlata tende ad essere particolarmente elevata ed a precedere l'evoluzione della malattia epatica.

Steatosi e steatoepatite: tra diagnosi ed infiammazione

La diagnosi di NAFLD primitiva richiede preliminarmente l'esclusione di cause secondarie di danno epatico (*Tabella 2*). La maggioranza dei pazienti con NAFLD non mostra segni o sintomi di malattia epatica al momento della diagnosi. L'evoluzione in cirrosi presenta le caratteristiche cliniche proprie di questa condizione. In corso di steatosi epatica l'aumento di alanina-aminotransferasi (ALT), aspartato-

Tabella 2 - Cause secondarie di steatosi epatica.

Nutrizionali	Farmaci	Metaboliche o genetiche	Altre
• Diggiuno prolungato • Malnutrizione proteico-calorica • Nutrizione parenterale totale • Rapido calo ponderale • Terapia chirurgica dell'obesità	• Acido Valproico • Amiodarone • Aspirina • Antivirali (HIV) • Calcio antagonisti • Cocaina • Estrogeni sintetici • Glucocorticoidi • Metotrexate • Tamoxifene • Tetraciclina	• Disbetalipoproteinemia • Lipodistrofia • Malattia di Wollman • Steatosi epatica acuta della gravidanza	• Epatotossine • Fosforo • Solventi organici • Alcool • Muffe e tossine fungine • Infezione • HCV • HIV • Citomegalovirus • Morbo di Crohn • Rettocolite ulcerosa • Tossine del <i>B. cereus</i>

aminotransferasi (AST) o entrambe è il più comune e, spesso, l'unico dato di laboratorio anomalo, tuttavia esso non è in grado di discriminare l'evoluzione a NASH (55). In genere l'aumento di questi due enzimi è inferiore a 4 volte il limite massimo di norma (LMN); diversamente dal danno alcolico, il rapporto AST/ALT è inferiore a 1 nella maggioranza dei casi (se superiore a 1 suggerisce la presenza di NAFLD di grado avanzato, se maggiore di 2 suggerisce la coesistenza di un danno da etanolo). Fosfatasi alcalina e gamma-glutamyl transferasi sono aumentate di 2-3 volte il LMN in meno della metà dei casi, mentre la presenza di iperglicemia, ipertrigliceridemia e/o riduzione delle HDL sono indice di un'associata sindrome metabolica. In circa il 50% dei pazienti si osserva un incremento dei livelli di ferritina sierica, nel 6-11% incremento della saturazione della transferrina, mentre l'indice di ferro epatico (concentrazione di ferro per grammo di tessuto epatico secco, diviso l'età del soggetto) è di solito nei limiti. Ferritinemia, sideremia e saturazione della transferrina, tuttavia, possono anche aumentare in altre condizioni infiammatorie e non risulta chiaro se tali aumenti siano legati primariamente alla patologia di base oppure secondari alla sottostante condizione necrotico-infiammatoria. In 1/3 dei casi sono

comunque presenti mutazioni a carico del gene HFE per l'emocromatosi ereditaria, ed in tali soggetti sembra possibile una maggiore evolutività della malattia (il dato è tuttavia controverso).

Non esiste un singolo marker biochimico in grado di confermare la presenza di NAFLD o di distinguere tra NAFLD e NASH e cirrosi. Alcuni biomarker hanno mostrato un ruolo potenziale nella valutazione del grado di malattia, ma necessitano di ulteriori studi per essere validati. Alcuni esempi di questi biomarker sono riportati nella *Tabella 3* (56-60). È possibile dosare alcune citochine pro-infiammatorie come l'IL-6 (valutabile sia nel fegato che nel plasma) o marker di apoptosi come i prodotti di clivaggio di alcune citocheratine. La citocheratina 18 (CK-18) è un valido marcatore diretto di apoptosi e indiretto di necrosi, per le patologie che coinvolgono le cellule epiteliali. La CK-18 è particolarmente abbondante negli epatociti e numerosi studi indicano che se la morte degli epatociti avviene tramite apoptosi, vi è un rilascio di cheratina 18 (clivata da caspasi) i cui frammenti possono essere dosati nel sangue (60).

Alcuni ricercatori hanno inoltre proposto modelli biostatistici non invasivi che considerando diversi parametri simultaneamente, possono identificare la presen-

Tabella 3 - Marker non invasivi di steatoepatite non alcolica (NASH).

Autori (anno)	Biomarker correlato con la presenza di NASH	Tipo di marker
Wieckowska (2006)	Incremento dei livelli circolanti di antigene M30 (citocheratina-8 clivata)	Marker di apoptosi
Kayadibi (2008)	Incremento dell'attività enzimatica della prolidasi sierica (SPEA)	Imidodipeptidasi coinvolta nella degradazione del collagene
Charlton (2008)	Incremento di deidroepiandrosterone (DHEA)	L'ormone steroideo più abbondante, capace di influenzare la sensibilità allo stress ossidativo, l'insulino sensibilità e l'espressione del recettore PPAR α e di mRNA procollagene
Canbakan (2008)	Riduzione dei livelli di leptina	Secreta dagli adipociti maturi in risposta alla massa adiposa. Modula la secrezione e l'attività insulinica; la sua espressione è influenzata dall'attività insulinica
Diab (2008)	Incremento di citocheratina-18	Biomarker sierico di apoptosi
Wieckowska (2008)	Incremento plasmatico di pentraxina-3	Molecola di adesione cellulare associata a disfunzione endoteliale

za di NASH con vari gradi di sensibilità e specificità. Un marker composito costituito dal dosaggio di citocheratina 18, adiponectina e resistina ha mostrato livelli di sensibilità e specificità rispettivamente del 95% e 70% nel predire la presenza di NASH (61); le evidenze a favore di questo marker non sono ancora sufficienti per poterlo raccomandare come test diagnostico. Sono stati inoltre realizzati alcuni modelli per la diagnosi del grado di fibrosi. Tra questi ricordiamo il Fibrotest, l'Hepascore e l'indice APRI (AST/platelet ratio index), tutti in grado di predire in maniera abbastanza accurata la presenza di fibrosi avanzata (62).

Tra gli esami strumentali utilizzati nel percorso diagnostico, un ruolo di primo piano spetta all'ecografia epatica. Il segno ecografico più specifico di steatosi epatica è il "bright liver ecopattern" la cui prima descrizione risale al 1979. Sulla base di alcuni parametri ecografici è possibile distinguere un grado di steatosi lieve, moderata e severa. La sensibilità dell'ecografia nella identificazione della steatosi è elevata, oscillando tra il 60 e il 94% nei diversi studi

ed è ovviamente maggiore nelle forme più gravi. L'ecografia non è in grado di differenziare la presenza di NASH dall'eventuale fibrosi. Esami utili sono anche la tomografia assiale computerizzata, che documenta una ridotta densità tissutale e presenta sensibilità variabile (ma in genere superiore al 90%) e la risonanza magnetica (NMR) che mostra valori di accuratezza diagnostica superiori rispetto all'ecografia e alla TC (63). Purtroppo nessuno di questi esami strumentali è in grado di rilevare in modo accurato la presenza di alterazioni infiammatorie e la biopsia epatica costituisce ancora il gold standard per la diagnosi, sebbene non tutti gli autori ne definiscano univocamente le indicazioni.

Conclusioni

Sono ormai numerose le evidenze a favore di un possibile ruolo della steatosi epatica, e in particolare della steatoepatite, nel determinismo della patologia cardiovascolare. Alla base di tale relazione si pone,

ragionevolmente, la SM e vede la NAFLD concorrere allo sviluppo di insulino-resistenza e dislipidemia aterogena attraverso uno stato infiammatorio in buona parte determinato dalla secrezione di mediatori epatici (IL-6, TNF- α , PCR, ...).

Se si volessero riassumere le proposte terapeutiche relative al trattamento “patogenetico” della steatosi/steatoepatite, non sarebbero sufficienti molte pagine (antiossidanti, epatoprotettori, ac. ursodesossilico, ...). Si tratta di interventi variamente motivati dalla opportunità di incidere su una eziopatogenesi complessa e solo parzialmente chiarita. Tuttavia, in modo simile a quanto disponibile per la SM, solo alcune di tali proposte sono risultate efficaci, in particolare gli interventi comportamentali volti ad ottenere un calo ponderale e il consumo di una dieta prudente (64). Anche il promettente impiego di insulino-sensibilizzanti (come metformina e pioglitazone) contribuisce a consolidare il ponte gettato tra SM e NAFLD.

GLOSSARIO

APOC3:	apolipoproteina C3
CK-18:	citocheratina 18
FFA:	acidi grassi liberi
HDL:	lipoproteine ad alta densità
IL:	interleuchina
IR:	insulino-resistenza
JNK:	chinasi c-Jun N-terminale
LDL:	lipoproteine a bassa densità
NAFLD:	steatosi epatica non-alcolica
NASH:	steatoepatite non-alcolica
NF-kB:	fattore nucleare kB
PAI-1:	inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno
PCR:	proteina C-reattiva
PNPLA3:	patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (adiponutrina)
PUFA:	acidi grassi polinsaturi
SM:	sindrome metabolica
SNP:	polimorfismo a singolo nucleotide
TGF-1β:	fattore di crescita tumorale 1-beta
TLR:	recettore toll-like
TNF-α:	fattore di necrosi tumorale alfa

Bibliografia

1. Gaddi AV, Cicero Arrigo FG (eds). Volume 1. Sindromi Metaboliche diagnosi, prognosi e terapia. Esculapio Società Editrice, Bologna, 2005.
2. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-28.
3. Rader DJ. Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med* 2007; 120: S12-S18.
4. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH: Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.
5. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 629-44.
6. Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 27-38.
7. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 202-8.
8. Sanyal AJ. NASH: a global health problem. *Hepatol Res* 2011; 41: 670-4.
9. Arun J, Clements RH, Lazenby AJ, et al. The prevalence of nonalcoholic steatohepatitis is greater in morbidly obese men compared to women. *Obes Surg* 2006; 16: 1351-58.
10. Weston SR, Leyden W, Murphy R, et al. Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 372-79.
11. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*. 2009; 13: 9-19
12. Loguercio C, De Simone T, D'Auria MV, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre clinical study by the Italian Association for the Study of the Liver. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 398-405.
13. Marzocchi R, Zannoni C, Moscatiello S, Marchesini G. La steatosi epatica non alcolica: una patologia emergente di interesse metabolico. *GIDM* 2004; 24: 107-15.

14. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-95.
15. Soresi M, Noto D, Cefalù AB, et al. Nonalcoholic fatty liver and metabolic syndrome in Italy: results from a multicentric study of the Italian Arteriosclerosis society. *Acta Diabetol* 2012; 49: [epub ahead of print]. DOI 10.1007/s00592-012-0406-1
16. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980; 55: 434-38.
17. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 113-21.
18. Tarantino G, Conca P, Riccio A, et al. Enhanced serum concentrations of transforming growth factor-beta1 in simple fatty liver: is it really benign? *J Transl Med* 2008; 6: 72.
19. Guzman G, Brunt EM, Petrovic LM, et al. Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis? *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1761-66.
20. Colicchio P, Tarantino G, del Genio F, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in young adult severely obese non-diabetic patients in south Italy. *Ann Nutr Metab* 2005; 49: 289-95.
21. Angulo P. NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology* 2006; 130: 1848-52.
22. K. F. Petersen, S. Dufour, A. Hariri, et al. Apolipoprotein C3 Gene Variants in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 1082-1089.
23. Kozlitina J, Boerwinkle E, Cohen JC, et al. Dissociation between APOC3 variants, hepatic triglyceride content and insulin resistance. *Hepatology* 2011; 53: 467-74.
24. Sentinelli F, Romeo S, Maglio C et al. Lack of effect of apolipoprotein C3 polymorphisms on indices of liver steatosis, lipid profile and insulin resistance in obese Southern Europeans. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 93.
25. Valenti L, Nobili V, Al-Serri A et al. The APOC3 T-455C and C-482T promoter region polymorphisms are not associated with the severity of liver damage independently of PNPLA3 I148M genotype in patients with nonalcoholic fatty liver. *J Hepatol* 2011; 55: 1409-14.
26. Hyysalo J, Stojkovic I, Kotronen A et al. Genetic variation in PNPLA3 but not APOC3 influences liver fat in NAFLD. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 951-6.
27. Romeo S, Kozlitina J, Xing C et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461-5.
28. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase 3 / adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 1209-17.
29. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 1883-94.
30. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1341-50.
31. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 2008; 49: 600-607.
32. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1212-1218.
33. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *J Hepatol* 2010; 53: 713-718.
34. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007; 132: 2169-80.
35. Stefan N, Kantartzis K, Haring HU. Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocr Rev* 2008; 29: 939-60.
36. Targher G, Chonchol M, Miele L, et al. Nonalcoholic fatty liver disease as a contribu-

- tor to hypercoagulation and thrombophilia in the metabolic syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 277-87.
37. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: e13-18.
 38. Green A, Rumberger JM, Stuart CA, et al. Stimulation of lipolysis by tumor necrosis factor alpha in 3T3L3 adipocytes in glucose dependent; implication for long term regulation of lipolysis. *Diabetes* 2004; 53: 74-81.
 39. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004 ; 16: 1095-105.
 40. Li Z, Yang S, Lin H, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-50.
 41. Tilg H, Hotamishgil GS. Nonalcoholic fatty liver disease cytokine adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006; 131: 934-45.
 42. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-45.
 43. Browning JD, Herto JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152.
 44. Byrne CD. Fatty liver: role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; 82: 265-72.
 45. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Free fatty acids induce JNK lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 12093-101.
 46. Pusl T, Wild N, Vennegeerts T, et al. Free fatty acids sensitize hepatocytes to bile acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 441-45.
 47. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-1846.
 48. Herbert T, Alexander RM. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-46.
 49. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Non-alcoholic fatty liver disease pathology e pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5 : 145-71.
 50. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-72.
 51. Vernia P, Marcheggiano A, Caprilli R, et al. Short chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Therap* 1995; 9: 309-13.
 52. Vijay KM, Aitken JD, Carvalho FA, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll like receptor 5. *Science* 2010; 328: 228-31.
 53. Sanjal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, el al. Pioglitazone, vitamin E or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010; 362: 1675-85.
 54. Soderberg C, Stal P, Askling J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28 year follow-up . *Hepatology* 2010; 51: 595-602.
 55. Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1682-98.
 56. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, et al. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33.
 57. Kayadibi H, Gultepe M, Yasar B, et al. Diagnostic value of serum prolidase enzyme activity to predict the liver histological lesions in nonalcoholic fatty liver disease: a surrogate marker to distinguish steatohepatitis from simple steatosis. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1764-71.
 58. Charlton M, Angulo P, Chalasani N, et al. Low circulating levels of dehydroepiandrosterone in histologically advanced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008; 47: 484-92.
 59. Canbakan B, Tahan V, Balci H, et al. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatology* 2008; 7: 249-54.
 60. Diab DL, Yerian L, Schauer P, et al. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatology* 2008; 6:1249-54.

61. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, et al. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 2008; 18: 1430-37.
62. Adams LA, MacQuillan GC, Jeffrey GP, et al. Non-invasive prediction of liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: the 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, CA, 2008.
63. Fishbein M, Castro F, Cheruku S, et al. Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 619-25.
64. Bonkamp S. The effect of an exercise training intervention on hepatic steatosis. The 59th Annual Meeting of the American association for the study of liver diseases. San Francisco. CA. 2008.