

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ**



***VALOAREA DIAGNOSTICĂ A BIOMARKERILOR SERICI
ÎN DEPISTAREA PRECOCE A FICATULUI GRAS NON-ALCOOLIC***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ADRIAN STREINU-CERCEL

Student-doctorand:

DR. LUMINIȚA MĂDĂLINA LEURZEANU

București

2019

Mulțumiri pentru susținerea deosebită în realizarea acestei teze:

Domnului Prof. Univ. Dr. Adrian Streinu – Cercel

Doamnei Prof. Univ. Dr. Ileana Constantinescu

Doamnei Conf. Univ. Dr. Laura Iliescu

Domnului Conf. Univ. Dr. Gener Ismail

Această teză de doctorat a fost parțial susținută în cadrul proiectului

CERO - PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN cod contract

POSDRU/159/1.5/S/135760 cofinanțat din Fondul Social European POSDRU 2007-2013

Axa prioritară1 - „Educația și formarea în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”/ Domeniul major de intervenție1.5 - „Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării”.

CUPRINS

LISTA CU LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	4
LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI	5
INTRODUCERE	7
I. PARTEA GENERALĂ	8
1.Generalități	8
1.1. Epidemiologia și etiologia ficatului gras non-alcoolic	8
1.2. Morfopatologia NAFLD	12
1.3. Patogenia NAFLD	15
1.4. Patologia asociată NAFLD	27
2.Diagnosticul NAFLD	30
2.1. Diagnosticul clinic	30
2.2. Diagnosticul paraclinic	30
2.2.1. Date de laborator	30
2.2.2. Evaluarea non-invazivă a fibrozei hepatice.....	31
2.2.3. Imagistica în NAFLD.....	33
2.2.4. Biopsia hepatică - metodă invazivă în diagnosticul NAFLD.....	35
2.3. Diagnosticul diferențial.....	40
3.Managementul NAFLD/NASH	44
3.1. Rolul exercițiului fizic	45
3.2. Alimentația	46
3.3. Terapia medicamentoasă.....	46
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	51
4.Valoarea diagnostică a biomarkerilor serici în depistarea precoce a ficatului gras non-alcoolic	51
4.1. Ipoteza de lucru și obiectivele studiului.....	51
4.2. Material și Metode	52
4.2.1. Pacienți.....	52
4.2.2. Criterii de includere.....	53
4.2.3. Criterii de excludere	53
4.2.4. Colectarea datelor.....	56
4.2.5. Metode de prelucrare statistică a datelor	58
4.2.6. Aspecte etice	59
4.3. Rezultate	59
4.3.1. Date clinice.....	59
4.3.2. Date paraclinice.....	61
4.3.3. Corelații clinico-biologice.....	86
4.4. Discuții.....	143
5.Concluzii și contribuții personale	151
BIBLIOGRAFIE	153
ANEXE	162

LISTA CU LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1. Ionel Copaci, Laurențiu Micu, Grethi Chiriac, Eugenia Mîndruț, Gener Ismail, **Luminița Leurzeanu**. Immunological and molecular mechanisms în NAFLD. Journal of Translational Medicine and Research. 2015; 20(4):206-214
<https://pdfs.semanticscholar.org/0de0/553a22ed05489430ea4397daca372f3c1b8b.pdf>
2. **Luminița Leurzeanu**, Laura Cârstocea. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: What We Need to Know. Surg. Gastroenterol. Oncol. 2019;24(2):80-85
<https://www.sgo-iasgo.com/article/non-alcoholic-fatty-liver-disease-what-we-need-to-know>

LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI

AASLD - American Association for the Study of Liver Diseases
ADN – acid dezoxiribonucleic
ADP – adiponectina
ADPN – adiponutrin
AIF – factorul de inducere a apoptozei
AIT – accident ischemic tranzitor
ALD – (alcohol liver disease) - boala hepatică alcoolică
ALT – alanin amino-transferaza
Apa f1 – factorul de activare al proteazei apoptoice
ASMA -(autoantibodies against smooth muscle) anticorpi antifibră musculară netedă
AST – aspartat amino-transferaza
AVC – accident vascular cerebral
BMI – (body mass index) - indexul de masă corporală
CRP – proteina C reactivă
CT – tomografie computerizată
CK18 – citokeratina 18
DZ – diabet zaharat
EASL - European Association for the Study of the Liver
EGF – factorul epidermal de creștere
FA - fosfataza alcalină
FADD - Fas Associate Deth Domain
FGF 21 – factorul de creștere fibroblastică
FPG – glicemia bazală, à jeune
FPI – insulină bazală, à jeune
GLUC4 - transportorului 4 al glucozei
GGT – gama glutamil-transpeptidaza
GNG – gluconeogeneză
HCC – carcinom hepatocelular
HDL – (high-density lipoprotein) - lipoproteine cu densitate crescută
HE – hematoxilina-eozină
HMGC_o – hidroxil malonil coreductaza
HOMA – modelul de homeostazie
HPS - hepassocin
HTA – hipertensiune arterială
Ig A – imunoglobulina A
Ig G – imunoglobulina G
IFN - gamma – interferon gama
IGF1 – factorul de creștere insulin-like 1

IL-1 - Interleukina 1
IL-6 – Interleukina 6
IL-6 R – receptorul Interleukina 6
IL-10 - Interleukina 10
IQR – interval interquartil
KLF 6 – Kruppel like-factor 6
LEP – leptina
LDL - (low-density lipoprotein) - lipoproteine cu densitate scăzută
M30 - Apoptosense M30
MCP-1 – proteina macrofagică chemotactică 1
ME – microscopia electronică
MIDD – (maternally inherited diabetes and deafness boala mitocondrială) – boala mitocondrială asociind diabet zaharat cu surzenie
MO – microscopia optică
NAFLD – (non-alcoholic fatty liver disease) - boala hepatică non-alcoolică
NAMPT - nicotinamide phosphoribosyltransferase
NASH – (non-alcoholic steatohepatitis) steatohepatită non-alcoolică
NK – natural killer
NF-kB – factor nuclear kinază-beta
OMS – Organizația Mondială a Sănătății
PAS – periodic acid-Schiff
PUFA - acizi grași polinesaturați
PPAR-gamma - receptor al peroxizomului proliferativ activat
REN – reticulul endoplasmic neted
RER – reticulul endoplasmic rugos
RI – receptorul insulinic
RMN – rezonanța magnetică nucleară
RPB-4 – proteina transportoare a retinolului
SPSS - Statistical Package for the Social Sciences
T-CD+4 – limfocite CD 4
TLR-4 - tall-like receptorul 4
TGF-beta 1 – factorul de creștere tumorală beta 1
TNF-alfa – factorul de necroză tumorală alfa
TNF- R1 – receptorul 1 TNF-alfa
VEM – volum eritrocitar mediu
VHB – virus hepatitic B
VHC – virus hepatitic C
VLDL – lipoproteine cu densitate scăzută
VSH – viteza de sedimentare a hematiilor
WHtR - raportul talie/înălțime

INTRODUCERE

În societatea post-modernă a secolului XXI...

industrializarea, digitalizarea și schimbarea stilului de viață prezente în țările puternic dezvoltate și a celor în curs de dezvoltare, au determinat creșterea prevalenței cazurilor de obezitate și sindrom metabolic.

Legătura strânsă între schimbarea obiceiurilor alimentare, a tipului de alimente și apariția obezității este o preocupare nu numai a medicilor nutriționiști și diabetologi.

Creșterea prevalenței cazurilor de toleranță alterată la glucoză și diabet zaharat nou descoperit la persoane din ce în ce mai tinere, precum și legătura strânsă între NAFLD/NASH, obezitate și diabet zaharat, face ca ficatul gras non-alcoolic să fie o temă actuală în preocupările multor specialiști, pe lângă nutriționiști, diabetologi și a medicilor gastroenterologi, cardiologi, oncologi și medici interniști.

Hepatopatiile cronice sunt la momentul actual o preocupare asiduă pentru specialiștii din multe țări, iar ficatul gras non-alcoolic - NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), ocupă o pondere din ce în ce mai ridicată în rândul acestora. Se poate aprecia astfel că prin creșterea prevalenței obezității și a tulburărilor metabolismului lipidic, impactul clinic și economic al steatozei hepatice non-alcoolice va deveni enorm.

Steatohepatita non-alcoolica - NASH (non-alcoholic steatohepatitis), se încadrează ca o boală fibrozantă hepatică progresivă către ciroza hepatică și hepatocarcinom, cu costuri socio-medicale foarte mari.

NAFLD este o preocupare actuală și pentru medicii pediatri, în condițiile în care a crescut prevalența obezității și a sindromului metabolic în rândul copiilor.

Plecând de la necesitatea diagnosticării precoce a acestei afecțiuni, lucrarea de față își propune să cerceteze în ce măsură determinări serologice uzuale și speciale, determinări antropometrice pot încadra afecțiunea, astfel încât să permită o stadializare corectă și o abordare terapeutică precoce și eficientă, tradusă în practică prin costuri mici din partea sistemului medical, păstrând acuratețea diagnostică.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Generalități

1.1. Epidemiologia și etiologia ficatului gras non-alcoolic

NAFLD este una din cele mai frecvente condiții patologice cronice hepatice la nivel mondial, având o prevalență în creștere de până la 10-30% din populația generală.[1] Prevalența globală a NAFLD după o metaanaliză recentă este de 25,24%, cu valorile cele mai crescute în Orientul Mijlociu și America, cea mai mică fiind în Africa, iar în țările dezvoltate având ponderi cuprinse între 15 - 45%.[1]

Steatoza hepatică non-alcoolică este considerată componentă a sindromului metabolic[2] ce asociază obezitatea cu diabetul zaharat (DZ), hipertensiunea arterială (HTA) și dislipidemia. Manifestările clinico-biologice ale steatozei hepatice non-alcoolice pot oscila de la steatoză hepatică non-alcoolică simplă, steatoză asociată cu inflamație medie (clasele 1 și 2 [3]), până la steatohepatită severă non-alcoolică - NASH (clasele 3 și 4 [3]).

Factorii etiologici ai steatozei hepatice non-alcoolice (NAFLD) sunt în principal: sindromul metabolic[2] (obezitatea, hipertrigliceridemia, diabetul zaharat) și secundari: by-passul jejuno-ileal[4] pentru obezitatea morbidă, nutriția parenterală totală prelungită, anumite medicamente (tamoxifen, amiodarone, diltiazem), expunerea profesională la solvenți organici.

1.2. Morfopatologia NAFLD

Ficatul intervine în metabolismul glucidic, proteic și mineral. Ficatul modulează polimerizarea glucidelor în glicogen și fosforilarea acestora. De asemenea intervine în procesul de gluconeogeneză[5] (sinteza glucidelor din lipide și proteine). Toate aceste procese sunt insulinodependente. Ficatul are funcție de echilibru proteic și funcție protein-formatoare, funcție ureogenă. În metabolismul lipidic, ficatul are rol în absorbția grăsimilor și în fosforilarea acestora, în sinteza și esterificarea colesterolului, sinteza lipoproteinelor și a fosfolipidelor, precum și a trigliceridelor.

Pe preparatele histologice, la nivel perisinusoidal se găsesc următoarele tipuri speciale de celule: celule Kupffer[6], celule hepatice stelate sau celule Ito[7], celulele "pit"-criptale[8].

Steatoza macroveziculară[9] este aspectul histologic cel mai frecvent întâlnit - hepatocitele conținând în aceste preparate o vacuolă lipidică mare și unică cu diametrul de 1-10 microni, care împinge nucleul la periferie. Steatoza microveziculară[10], mai puțin frecventă, se caracterizează prin numeroase picături mici, cu diametrul sub 1 micron, care înconjoară nucleul.

1.3. Patogenia NAFLD

În patogenia NAFLD/NASH sunt implicați următorii factori: mecanisme inflamatorii[11] prin intermediul citokinelor și anomalii ale metabolismului lipidic cu generarea de produși oxidoreactivi[12] (creșterea peroxidării lipidelor hepatice). Acești doi factori reprezentând **teoria dublei lovituri**[13]. Se consideră că acționează simultan mai multe mecanisme patogenice care determină procese pro și antioxidante, conducând la apariția necrozei și fibrozei hepatocitare[14].

Disfuncția mitocondrială reprezintă principalul mecanism care face legătura între obezitate și bolile metabolice. Acumularea de specii reactive de oxigen care rezultă din descreșterea activității lanțului respirator determină acumularea de grăsimi oxidate, ce apar din peroxidarea lipidică[12] și care declanșează, inflamația[11] necroza și fibroza[14].

Conceptul de inflamație[11] în obezitate a fost introdus de Hotamisigil, care a observat relația dintre obezitate, creșterea expresiei TNF-alfa[15-17] (la nivelul adipocitelor) și a activității insulinice în aceste celule. Atât TNF-alfa[15-17] cât și receptorul său se corelează cu indexul de masă corporală BMI.

TNF-alfa[15-17] (**tumor necrosis factor**) – citokină proinflamatorie cu rol de a liza celulele tumorale și de a determina necroză hemoragică la nivelul tumorilor transplantate (pe modele animale).

Adiponectina (ADP)[16-18] este o proteină sintetizată exclusiv de către adipocite. Spre deosebire de alți hormoni secretați de țesutul gras, producția acesteia scade la pacienții obezi. Gena ADP se găsește la nivelul cromozomului 3.[16-20]

Leptina (LEP)[16,17,21] este o proteină cu greutate moleculară 16 KDa, produsă la nivelul adipocitelor. La nivel hipotalamic se leagă de receptorii alfa-melanocortin și determină inhibarea neuropeptidului y, inducând sațietatea. Leptina are rol și în procesul de reproducere, reglând secreția de gonatropin-Rh la nivel hipotalamic.[16,17,20-22]

Interleukina 6 (IL-6)[16,17,23] este un polipeptid format din 184 aminoacizi cu greutate moleculară de 21 KDa. Este o citokină produsă de macrofage, limfocitele T și B, fibroblaști, celulele endoteliale, keratinocite, condrocite, adipocite. Aceasta apare ca răspuns la infecții bacteriene/virale, inflamație și traumatisme. De asemenea este considerată cel mai puternic inductor al producției hepatice de reactanți de fază acută (fibrinogen, proteina C reactivă, amiloid seric A, haptoglobina și complement).[16,17,20,23-26]

Apoptosense M 30[27] – **anticorpi anti-CK 18** (anti-citokeratina 18) este o metodă foarte utilă și reproductibilă a detectării apoptozei[28] la nivelul celulelor epiteliale citokeratin 18 (CK18). Este un anticorp monoclonal care recunoaște un neo-epitop (K18Asp396) al citokeratinei 18 (CK18) care rezultă după scindarea prin caspaze.[27]

Sindromul metabolic / insulinorezistența ca parte integrantă a NAFLD/NASH au la bază alterarea metabolismului glucidic și secundar alterarea nivelului plasmatic al glucozei. [2, 29] Insulinorezistența[29] a fost demonstrată la pacienții cu NAFLD/NASH prin tehnica HOMA[30].

1.4. Patologia asociată NAFLD

S-a demonstrat prin studii clinice că pacienții cu NAFLD/NASH au un risc mai mare să dezvolte: **boli cardiovasculare** (îngroșarea spațiului intimă-medie la nivel carotidian), **boli cerebrovasculare** (AIT, AVC non-fatal), **boli vasculare periferice** și **afectare microvasculară** (retinopatie și nefropatie).

Obezitatea abdominală - adipozitatea viscerală (grăsimea intraabdominală) se află distribuită în cavitatea peritoneală, printre organele interne. Pentru definirea diagnosticului de obezitate centrală se folosesc trei parametri: **circumferința taliei** (circumferința abdominală), **raportul talie-înălțime** (WHtR) și **indexul de masă corporală** (BMI).

2. Diagnosticul NAFLD

2.1. Diagnosticul clinic

Tabloul clinic al pacienților cu steatoză hepatică non-alcoolică este variabil și depinde de tipul depozitelor lipidice și de etiologia bolii. Cel mai adesea pacienții sunt asimptomatici, uneori prezintă disconfort sau sensibilitate la palpare în hipocondrul drept.

2.1.1. Date de laborator

Steatoza hepatică nu determină constant modificări biochimice. În NAFLD/NASH pot apărea creșteri ale nivelului transaminazelor AST și ALT, cu o valoare mai mică decât dublul normalului. De asemenea, poate crește GGT și moderat poate crește fosfataza alcalină (FA). Raportul $AST/ALT > 2$ sugerează etiologia alcoolică a bolii hepatice, în timp ce în NAFLD raportul este $AST/ALT < 1$. [31] La pacienții cu steatoză hepatică este indicat screening-ul markerilor virali hepatitici, existând asociere frecventă a steatozei hepatice cu infecția VHC [32].

2.1.2. Imagistica în NAFLD

Echografia [33] - diagnosticul ultrasonografic al NAFLD este o metodă uzuală de apreciere a structurii hepatice, cu mare grad de subiectivitate, rezultatele variind în funcție de examinator și de tipul de aparat folosit. **Examenul CT** [34] (computer-tomografia abdominală) în diagnosticul NAFLD este o tehnică imagistică optimă pentru evidențierea grăsimii hepatice, fiind însă o tehnică scumpă. **Utilitatea RMN** [35] pentru evaluarea steatozei hepatice presupune achiziționarea de secvențe care diferențiază apa de țesutul gras și permite detectarea fidelă a încărcării grase a ficatului.

Diagnosticul diferențial al NAFLD/NASH se face cu: steatoza alcoolică, lipodistrofia, boli mitocondriale (ex: Boala Madelung, boala Weber-Christian), steatoza drog-indusă (ex: tamoxifen, glucocorticoizi, terapia antiretrovirală la pacienții cu HIV), bolile metabolice (ex: boala Wilson, tirozinemia, sindromul ovarelor polichistice), steatoza secundară procedurilor chirurgicale (ex: by-pass-ul jejun-ileal, derivațiile biliopancreatice), steatoza din cadrul nutriției parenterale sau a malnutriției.

Steatohepatita non-alcoolică vs. steatohepatita alcoolică - se discută încă limita nivelului consumului de alcool în ficatul gras non-alcoolic. Acest diagnostic diferențial rămâne principala provocare în departajarea tipului de steatoză hepatică.

3. Managementul NAFLD/NASH

Modificarea stilului de viață, scăderea în greutate și exercițiile fizice reprezintă setul de măsuri indicate pe lângă tratamentul medicamentos în ficatul gras non-alcoolic.[36] Acest cumul de măsuri se impune datorită existenței la majoritatea cazurilor a obezității, sindromului metabolic[2] / insulinorezistenței[29]. Pierderea în greutate și exercițiul fizic au un rol major în mecanismul de semnalizare insulinică de la nivelul adipocitelor. Utilizarea tiazolindionelor[37] aduce beneficii ca agent terapeutic în NASH. Apare îmbunătățirea sensibilității la insulină și astfel se previne activarea c-jun kinazei de la nivelul adipocitelor. Această kinază are rol de a diminua responsivitatea adipocitelor la insulină.

3.1. Rolul exercițiului fizic

Studiile recente au evidențiat faptul că asocierea dietei de 1200-1500 Kcal/zi cu activitatea fizică (mers, fitness) determină scăderea în greutate.

3.2. Alimentația

Anumite alimente sau componente ale acestora cresc insulinorezistența[29] și favorizează lipotoxicitatea hepatică[12]. Astfel, consumul ridicat de grăsimi poate induce tranzitor insulinorezistență[29], chiar și în absența obezității sau a diabetului zaharat.

3.3. Terapia medicamentoasă

Indicațiile de tratament în NAFLD/NASH nu sunt încă bine stabilite. S-a convenit că stetohepatita are indicație fermă de tratament medicamentos, pe lângă recomandările ferme de schimbare a stilului de viață, exercițiul fizic și dietă. Agenții farmacologici utilizați în NASH se pot grupa în: agenți ce acționează asupra insulinorezistenței (glitazone, agenți care induc scăderea în greutate, metforminul etc), hepatoprotectoarele (acid ursodeoxicolic, agenți citoprotectori cum ar fi pentoxiflin și probucol, agenți antiinflamatori, acizi omega-3 polinesaturați - PUFA, agenți antiapoptoici etc), agenți antioxidanți (vitamina C și vitamina E, N-acetil cisteina, betaina etc), hipolipemiante (gemfibrozilul, clofibratul), statine - inhibitori ai HMGCo reductazei (atorvastatină etc), sartanii (atacand, losartan etc), probiotice (*Bifidobacterium bifidum* și din categoria *Lactobacillus: plantarum, deslbrueckii, acidophilus, rhamnosus* etc).

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

4. Valoarea diagnostică a biomarkerilor serici în depistarea precoce a ficatului gras non-alcoolic

4.1. Ipoteza de lucru și obiectivele studiului

Lucrarea de față are ca scop determinarea non-invazivă a inflamației din NAFLD/NASH prin utilizarea markerilor și biomarkerilor serici și compararea acestora cu: date antropometrice și testele standardizate (Fibromax[38] și Elastografie-Fibroscan[39]). Alegerea biomarkerilor enumerați mai jos s-a făcut din panelul de biomarkeri care caracterizează sindromul inflamator[11] din NAFLD, comparând studiile din literatura de specialitate.

Biomarkerii serici specifici inflamației din NAFLD/NASH aleși pentru această lucrare sunt: **Adiponectina (ADP), Leptina (LEP), Interleukina-6 (IL-6), Apoptosense-M30.**[16-27]

Obiectivele studiului – stabilirea corelațiilor între biomarkeri/markeri serici și datele antropometrice și interrelația între biomarkerii serici aleși care caracterizează NAFLD/NASH cu: ecografia abdominală și cu testele standardizate (Fibromax[38] și Elastografie-Fibroscan[39]). Pentru aceasta s-au colectat următoarele date:

- date personale și antropometrice (vârstă, sex, înălțime, greutate, circumferința abdominală)
- hemogramă (Hb, VEM, leucocite, trombocite)
- markeri serici de inflamație nespecifică (VSH, CRP)
- nivelul seric al markerilor biochimici asociați obezității (evaluarea metabolismului lipidic și glucidic)
- nivelul seric al markerilor biochimici de sinteză proteică, citoliză hepatică și de colestază
- nivelul seric al biomarkerilor specifici aleși, de inflamație adipocitară, hepatică și apoptoză: Adiponectina (ADP), Leptina (LEP), Interleukina-6 (IL-6), Apoptosense-M30
- ecografia abdominală de rutină

- testele standardizate Fibromax[38]: FibroTest, SteatoTest, NashTest
- testul standardizat Elastografie-Fibroscan[39]: Stiffness

4.2. Material și Metode

4.2.1. Pacienți

Am efectuat un studiu observațional longitudinal pe un lot de 456 de pacienți internați în Clinica de Medicină Internă a Institutului Clinic Fundeni în perioada martie 2015 - iunie 2017 cu diagnostic de hepatopatie cronică. S-au calificat, conform criteriilor de includere și de excludere, un lot de 96 pacienți eligibili pentru studiu. Limitarea la 96 de pacienți a fost dată de numărul de determinări existente în kit-urile de biomarkeri. În final s-au validat 87 de determinări, care au format lotul de studiu.

4.2.2. Criterii de includere

La selectarea pacienților eligibili pentru studiu au fost aplicate următoarele criterii de selecție: vârsta între 18 și 80 ani, suspiciune clinică actuală sau diagnostic anterior de NAFLD, semnarea unui acord informat aprobat de Comisia de Etică a Institutului Clinic Fundeni.

Definiție de caz: NAFLD a fost definită pe baza modificărilor biochimice, ecografice și a evaluărilor non-invazive ale fibrozei hepatice, stabilite și standardizate în ghidurile clinice internaționale EASL și AASLD.

4.2.3. Criterii de excludere

S-au exclus:

- pacienții cu hepatopatie virală cronică, hepatopatii autoimune, consumul recunoscut de etanol, hepatopatii cu compenentă genetică, hepatopatii cu origine vasculară, hepatopatii de etiologie cardiacă, hepatopatii în boli hematologice
- pacienții care au beneficiat de transplant de organe solide sau măduvă osoasă, pacienții fără diagnostic (până la momentul prezentării) de diabet zaharat tip 1 sau 2, pacienții cu intervenții chirurgicale în sfera abdominală superioară
- pacienții cu boala renală cronică sau patologii inflamatorii cronice
- pacienții care urmează corticoterapie inhalatorie sau sistemică
- pacienți cu patologii neoplazice active sau în primii 5 ani după tratament curativ și hepatopatii medicamentoase

În lotul de 87 de pacienți, vârsta medie este de 54,95 ani. Din lotul de 87 de pacienți 41 sunt de sex masculin. Repartiția pe sexe este reprezentată în **Tabelul 4.1**.

Tabelul 4.1. Repartiția lotului studiat în funcție de sex

Repartiția lotului studiat în funcție de sex					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion (%)</i>	<i>Procent din datele validate (%)</i>	<i>Procent cumulativ (%)</i>
<i>Date validate</i>	<i>Masculin</i>	41	47,1	47,1	47,1
	<i>Feminin</i>	46	52,9	52,9	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

4.2.4. Colectarea datelor

Pacienții eligibili au fost evaluați pe baza unui *chestionar de ghidare* a anamnezei, precum și pe baza unei *fișe clinice* conținând date antropometrice, de laborator și imagistice.

Toate analizele și determinările s-au făcut în cadrul Institutului Clinic Fundeni. Determinarea biomarkerilor specifici (*adipokine/citokine*) s-a făcut cu ajutorul kit-urilor: **Human Adiponectin (ADP) ELISA Kit**, **Human Leptin (LEP) ELISA Kit**, **Interleukin 6 (IL-6) ELISA Kit**, **M30 Apoptosense ELISA - CK18 Kit**.

4.2.5. Metode de prelucrare statistică a datelor

În cadrul cercetării, pe lângă analiza descriptivă a variabilelor (medie, mediană, valoare modală, abatere standard, minimul și maximum), având în vedere tipul acestora și obiectivele formulate, am folosit metodele: **ANOVA One-Way**[40], **Testul post hoc Bonferroni**[40], **Tabelul încrucișat**[41], **Testul χ^2 (chi-pătrat)**[42], **Coeficientul de corelație Spearman (rho)**[43] pentru analizarea și interpretarea datelor.

4.2.6. Aspecte etice

S-a respectat principiul de bază al eticii medicale și al cercetării medicale și anume acela al asigurării consimțământului informat.

4.2.7. Date clinice

Date antropometrice - procentul (%) celor cu circumferința taliei crescută și al celor cu talie normală din total - în ceea ce privește circumferința taliei, **la majoritatea** pacienților (75%) se constată valori crescute ale acesteia.

Tabel 4.3. Datele privind circumferința taliei la lotul studiat.

Circumferința taliei					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulativ</i>
<i>Date validate</i>	<i>valori normale fiziologice</i>	12	13,8	13,8	13,8
	<i>valori crescute</i>	75	86,2	86,2	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

Datele privind **indicele de masă corporală (BMI)** la lotul studiat - procentul (%) celor cu obezitate și încadrare în funcție de grad (supraponderal, obez grad I, II, III, morbidă) - **mai mult de jumătate** dintre pacienți (58,6%) au un indice de masă corporală ce indică obezitate de gradul II, iar 31% au obezitate de gradul I. Doar 6,9% sunt normoponderali, iar 3,4% au obezitate de gradul III.

Tabel 4.4. Date privind greutatea pacienților BMI

Indice de masă corporală (BMI)					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulativ</i>
<i>Date validate</i>	<i>normoponderal</i>	6	6,9	6,9	6,9
	<i>supraponderal, obezitate gradul I</i>	27	31,0	31,0	37,9
	<i>obezitate gradul II</i>	51	58,6	58,6	96,6
	<i>morbidă, obezitate gradul III</i>	3	3,4	3,4	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

4.2.8. Date paraclinice

Fișa Clinică conține date paraclinice culese pentru evaluarea pacienților eligibili.

Trombocite - trombocitopenia (semn de ciroza hepatică) este constatată la doar 8% dintre subiecții studiului. La 89,7% dintre subiecți numărul trombocitelor se situează în limite normale, iar la 2,3% se constată valori crescute.

Tabel 4.8. Trombocite

Trombocite					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulativ</i>
<i>Date validate</i>	<i>valori scăzute</i>	7	8,0	8,0	8,0
	<i>valori normale fiziologice</i>	78	89,7	89,7	97,7
	<i>valori crescute</i>	2	2,3	2,3	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

Trigliceridele serice (determinant al metabolismului lipidic) - jumătate dintre subiecții studiului (49,4%) au valori crescute peste limitele normale, iar cealaltă jumătate (50,6%) au valori normale.

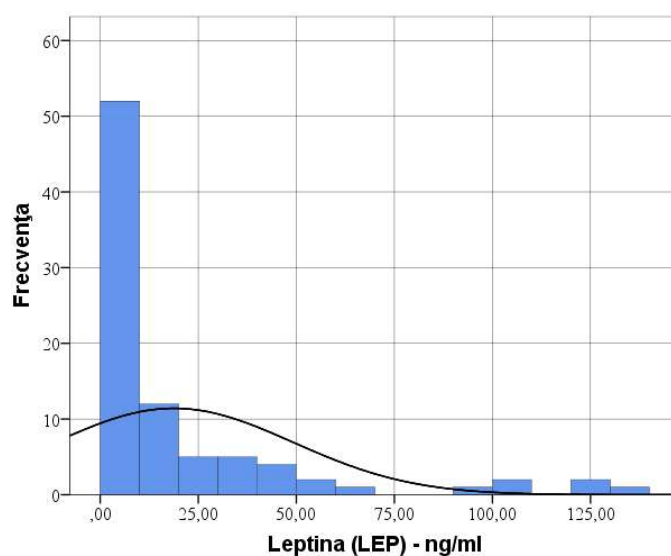
Tabel 4.17. Trigliceride

Trigliceride					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulativ</i>
<i>Date validate</i>	<i>valori normale fiziologice</i>	44	50,6	50,6	50,6
	<i>valori crescute</i>	43	49,4	49,4	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

Determinarea serică a leptinei Leptina (LEP) - se constată că valoarea medie a leptinei la subiecții studiului este de 18,77 ng/ml, iar mediana de 5,10 ng/ml. Valorile leptinei se abat de la medie - plus / minus - cu 30,40 ng/ml. Valoarea minimă constatată a fost de 0,10 ng/ml, în timp ce valoarea maximă a fost de 137,80 ng/ml.

Tabel 4.25. Leptina (LEP) - statistică descriptivă

<i>Statistici descriptive</i>		
Leptina (LEP) - ng/ml		
<i>Nr.</i>	<i>Date validate</i>	87
	<i>Date lipsă</i>	0
<i>Media</i>		18,7795
<i>Mediana</i>		5,1000
<i>Abaterea standard</i>		30,40483
<i>Valoare minimă</i>		,10
<i>Valoare maximă</i>		137,80

**Figura 4.25. Leptina (LEP) - statistică descriptivă**

Leptina (LEP) - aproximativ jumătate dintre subiecți (49,4%) au avut valori scăzute ale leptinei, sub limita normală, în timp ce cealaltă jumătate dintre subiecți au avut valori fiziologice ale Leptinei. La 2 pacienți (2,3%) valorile constatate au fost peste limitele normale.

Tabel 4.26. Leptina (LEP)

Leptina (LEP)					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulativ</i>
<i>Date validate</i>	<i>valori scăzute</i>	43	49,4	49,4	49,4
	<i>valori normale fiziologice</i>	42	48,3	48,3	97,7
	<i>valori crescute</i>	2	2,3	2,3	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

Adiponectina (ADP) - analizată în funcție de *riscul pentru rezistența la insulină* și *arterioscleroză*. Astfel, la 20,7% s-a constatat un risc scăzut, la 4,6% un risc normal, la 12,6% un risc crescut, în timp ce la 61,1% s-a constatat un risc foarte mare.

Tabel 4.27. Adiponectina (ADP)

Adiponectina (ADP)					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulat</i>
<i>Date validate</i>	<i>risc scăzut</i>	18	20,7	20,7	20,7
	<i>normal</i>	4	4,6	4,6	25,3
	<i>risc crescut</i>	11	12,6	12,6	37,9
	<i>risc foarte mare</i>	54	62,1	62,1	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

Apoptosense M30 - la 18,4% dintre subiecții studiului nivelul apoptosense M30 a fost peste limitele fiziologice.

Tabel 4.28. Apoptosense M30

Apoptosense M30					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulat</i>
<i>Date validate</i>	<i>valori normale fiziologice</i>	71	81,6	81,6	81,6
	<i>valori crescute</i>	16	18,4	18,4	100,0
	<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

Interleukina 6 (IL-6) - la *toți pacienții* luați în studiu nivelul IL-6 *valorile au fost peste limita fiziologică*.

Tabel 4.29. Interleukina 6 (IL-6)

Interleukina 6 (IL-6)					
		<i>Frecvența</i>	<i>Procent din total eșantion</i>	<i>Procent din datele validate</i>	<i>Procent cumulat</i>
<i>Date validate</i>	<i>valori crescute</i>	87	100,0	100,0	100,0

4.2.9. Corelații clinico-biologice

În cadrul corelațiilor clinico-biologice s-au făcut următoarele asocieri:

- Date antropometrice (*Talie, BMI*) cu markeri ai metabolismului lipidic (*colesterol seric și trigliceride*) și cu BioMarkeri specifici (*Adiponectina, Leptina, IL-6, Apoptosense M30*)
- BioMarkeri specifici (*Adiponectina, Leptina, IL-6, Apoptosense M30*) cu *Steatoza hepatică* evaluată *Echografic*, cu Fibroscan - *Stiffness* și cu Fibromax (*FibroTest, SteatoTest și NashTest*)
- Relația între BioMarkerii specifici *Leptină (LEP)* și *Adiponectină (ADP)*
- Relația între *Adiponectina (ADP), Leptina (LEP), IL-6, Apoptosense M30*
- Relație între *Steatoza hepatică* evaluată *Echografic* și *SteatoTest* (Fibromax)
- Relația între nivel *Albuminei* serice și *dimensiunile Splinei* (echografie)
- Interrelații între *dimensiunile echografice ale Lobului Drept hepatic și ale Splinei* cu Fibroscan - *Stiffnes* și cu Fibromax (*FibroTest, SteatoTest și NashTest*)

Relația dintre Leptina (LEP) și Adiponectina (ADP) - deși analiza corelațională bazată pe coeficientul de corelație *Spearman*[43] a arătat o *relație semnificativă statistic* între *Leptina (LEP)* și *Adiponectina (ADP)*, în sensul în care creșterea uneia dintre ele este însoțită de creșterea celeilalte, rezultatele obținute în urma aplicării *testului chi-pătrat*[42], care indică asocierea dintre cele două variabile, ne arată că aceasta *nu este semnificativă statistic* ($\chi^2 = 9,948$; $df = 6$, $p = 0,127$).

Tabel 5.88. Leptina (LEP) vs Adiponectina (ADP) - testul chi-pătrat

Testul chi-pătrat			
	Valoare	Gradele de libertate - <i>df</i>	Pragul de semnificație - <i>p</i>
<i>Pearson Chi-Square</i>	9,948	6	,127
<i>Număr cazuri validate</i>	87		

Tabel 4.87. Leptina (LEP) vs Adiponectina (ADP) - tabel încrucișat

Tabel încrucișat							
			Adiponectina (ADP)				Total
			risc scăzut	normal	risc crescut	risc foarte mare	
Leptina (LEP)	valori scăzute	Frecvența	10	1	6	26	43
		%	23,3%	2,3%	14,0%	60,5%	100,0%
	valori normale fiziologice	Frecvența	6	3	5	28	42
		%	14,3%	7,1%	11,9%	66,7%	100,0%
	valori crescute	Frecvența	2	0	0	0	2
		%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
Total		Frecvența	18	4	11	54	87
		%	20,7%	4,6%	12,6%	62,1%	100,0%

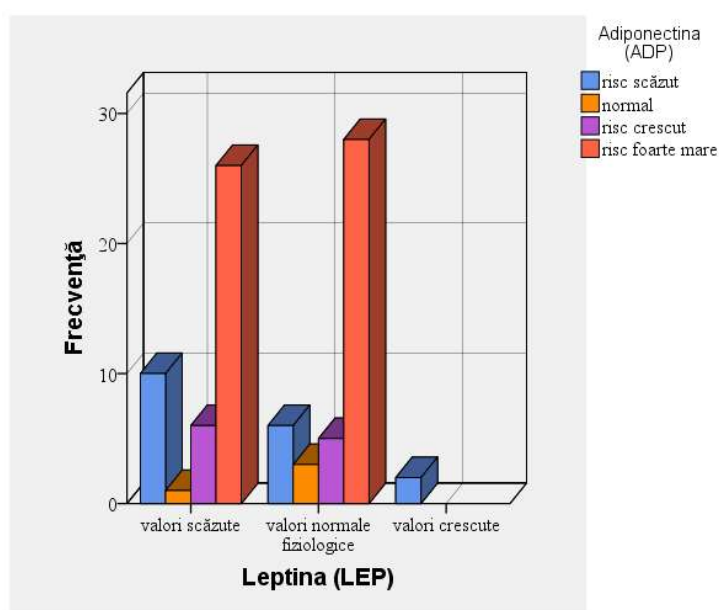


Figura 4.53. Leptina (LEP) vs Adiponectina (ADP) - (conform tabel încrucișat)

Se constată un număr mare de subiecți cu un risc foarte mare pentru rezistență la insulină, atât în rândul celor cu valori scăzute ale leptinei, cât și în rândul celor cu un nivel normal al leptinei.

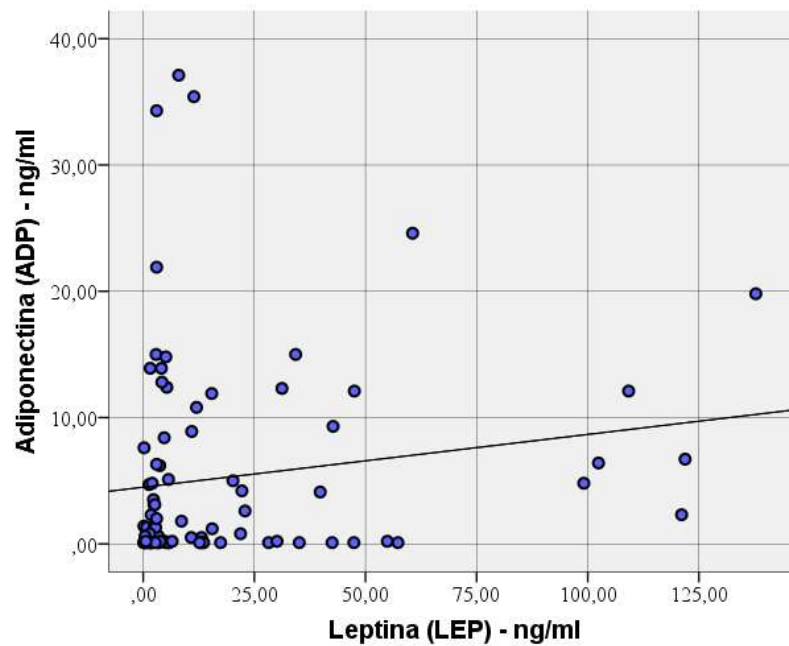


Figura 4.54. Leptina (LEP) vs Adiponectina (ADP)

Leptina (LEP) - Adiponectina (ADP) - Interleukina 6 (IL-6) - Apoptosense M30

Am folosit coeficientul de corelație *Spearman*[43] în determinarea relației dintre nivelurile *Leptinei (LEP)*, *Adiponectinei (ADP)*, *Interleukina 6 (IL-6)*, *Apoptosense M30*, deoarece, din analiza normalității variabilelor, nu s-au îndeplinit pentru folosirea coeficientului Pearson, toate condițiile. S-a pornit de la 2 ipoteze pentru a măsura relația dintre variabilele mai sus menționate:

- Ipoteza ***H0***: Nu există o legătură semnificativă între variabile
- Ipoteza ***H1***: Există o legătură semnificativă între variabile

Între următoarele perechi de variabile se observă **corelații pozitive semnificative statistic**, prin analiza de corelație bivariată, bazată pe coeficientul de corelație *Spearman*[43]:

- ***Leptina (LEP)* și *Adiponectina (ADP)*** - ($\rho=0,212$; $p=0.048$);
- ***Leptina (LEP)* și *Interleukina 6 (IL-6)*** - ($\rho=0,219$; $p=0.041$).

Valori scăzute ale *Leptinei (LEP)* sunt însoțite de *valori scăzute* ale *Adiponectinei (ADP)* și ale *Interleukinei 6 (IL-6)*, iar *valori crescute* ale *Leptinei (LEP)* sunt însoțite de *valori crescute* ale *Adiponectinei (ADP)* și ale *Interleukinei 6 (IL-6)*. Valoarea *testului rho*[43] este interpretabilă prin ea însăși, exprimând intensitatea asocierii dintre variabile. O valoare a lui rho sub 0,3 arată o corelație scăzută între variabile, în modelul de descriere propus de Hopkins (2000) cu privire la interpretarea valorilor coeficienților de corelație. În cazul nostru, *corelații* între cele *două perechi* de variabile sunt de *intensitate redusă*.

Tabel 4.90. Corelații

Leptina (LEP) / Adiponectina (ADP) / Interleukina 6 (IL-6) / Apoptosense M30

Corelații						
			<i>LEP</i> <i>ng/ml</i>	<i>ADP</i> <i>ng/ml</i>	<i>IL-6</i> <i>pg/ml</i>	<i>M30</i> <i>U/l</i>
Spearman's rho	<i>LEP</i> <i>ng/ml</i>	<i>Coeficientul de corelație</i>	1,000	,212*	,219*	-,054
		<i>Pragul de semnificație p</i>	.	,048	,041	,621
		<i>N</i>	87	87	87	87
	<i>ADP</i> <i>ng/ml</i>	<i>Coeficientul de corelație</i>	,212*	1,000	,005	-,066
		<i>Pragul de semnificație p</i>	,048	.	,966	,542
		<i>N</i>	87	87	87	87
	<i>IL-6</i> <i>pg/ml</i>	<i>Coeficientul de corelație</i>	,219*	,005	1,000	-,120
		<i>Pragul de semnificație p</i>	,041	,966	.	,266
		<i>N</i>	87	87	87	87
	<i>M30 -</i> <i>U/l</i>	<i>Coeficientul de corelație</i>	-,054	-,066	-,120	1,000
		<i>Pragul de semnificație p</i>	,621	,542	,266	.
		<i>N</i>	87	87	87	87
*. Corelația este semnificativă la un prag de 0,05.						

Leptina (LEP) - Adiponectina (ADP) - Interleukina 6 (IL-6) - Apoptosense M30; pentru analiza normalității distribuției celor patru variabile: *Leptina (LEP)*, *Adiponectina (ADP)*, *Interleukina 6 (IL-6)*, *Apoptosense M30*, s-au utilizat testele *Kolmogorov-Smirnov* și *Shapiro-Wilk* (SPSS).[42] Deoarece lotul analizat are doar 87 de pacienți, la analiza normalității distribuției *se potrivește* mai mult testul *Shapiro-Wilk*. [42] Pentru că nivelul de semnificație p, în cazul testării normalității, este: $p < 0.05$, putem spune că cele *patru variabile* analizate *nu sunt normal distribuite*.

Tabel 4.89. Testarea normalității distribuției

Leptina (LEP) / Adiponectina (ADP) / Interleukina 6 (IL-6) / Apoptosense M30

<i>Testarea normalității distribuției</i>						
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	<i>Valoare</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Valoare</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>Leptina (LEP) - ng/ml</i>	,269	87	,000	,629	87	,000
<i>Adiponectina (ADP) - ng/ml</i>	,261	87	,000	,684	87	,000
<i>Interleukina 6 (IL-6) - pg/ml</i>	,481	87	,000	,123	87	,000
<i>Apoptosense M30 - U/l</i>	,274	87	,000	,590	87	,000

Corelație între nivelul Albuminei și dimensiunile Splinei din examenul ecografic

- pentru a face o corelație între nivelul albuminei și dimensiunile splinei din examenul ecografic am folosit analiza de varianță **ANOVA One-Way**[40]. Rezultatul a arătat că **nu există o diferență semnificativă** statistic între dimensiunile medii ale **Splinei** raportat la nivelele **Albuminei** (scăzut, normal sau crescut). Se observă că dimensiunea medie a splinei la pacienții cu valori scăzute ale albuminei a fost de 9,42 cm, la pacienții cu albumina în limite normale dimensiunea medie a splinei a fost de 10,36 cm, iar la pacienții cu valori crescute ale albuminei, dimensiunea medie a splinei a fost de 9,96 cm.

Tabel 4.95. Albumină vs Splina (cm)- statistica descriptivă

<i>Statistici descriptive</i>									
Splina (cm)									
		<i>Nr</i>	<i>Media</i>	<i>Abaterea standard</i>	<i>Eroarea standard</i>	<i>95% Intervalul de încredere a mediei</i>		<i>Min.</i>	<i>Max.</i>
						<i>Limita minimă</i>	<i>Limita maximă</i>		
Albumină	<i>valori scăzute</i>	5	9,4200	1,36638	,61106	7,7234	11,1166	8,50	11,80
	<i>valori normale fiziologice</i>	79	10,3684	1,51349	,17028	10,0294	10,7074	8,10	13,60
	<i>valori crescute</i>	3	9,9667	1,45717	,84130	6,3469	13,5865	8,30	11,00
	<i>Total</i>	87	10,3000	1,50565	,16142	9,9791	10,6209	8,10	13,60

Tabel 4.94. Splina (cm) - ANOVA

<i>ANOVA One-Way</i>					
Splina (cm)					
	<i>Suma pătratelor</i>	<i>Gradele de libertate - df</i>	<i>Media pătrată</i>	<i>F</i>	<i>Pragul de semnificație - p</i>
<i>Între grupuri</i>	4,574	2	2,287	1,009	,369
<i>În interiorul grupurilor</i>	190,386	84	2,266		
<i>Total</i>	194,960	86			

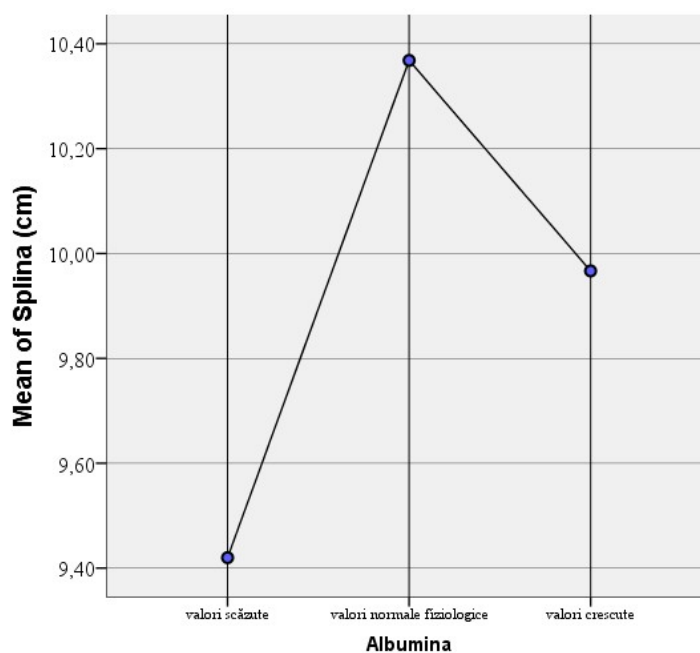


Figura 4.56. Albmina vs Splina - (conform statistică descriptivă)

5. Concluzii și contribuții personale

Mai mulți biomarkeri care sunt asociați cu inflamația și apoptoza au fost studiați individual pentru performanțele lor, în încercare de a face distincția între NASH și steatoza simplă non-alcoolică. S-a încercat de asemenea și detectarea diferitelor stadii de steatoză hepatică non-alcoolică folosind un panel variat de biomarkeri. Studiile publicate în literatura de specialitate privind utilizarea biomarkerilor au dat până acum rezultate controversate.

➤ În prezentul studiu, valorile adiponectinei au indicat un risc crescut pentru insulinorezistență și arterioscleroză la majoritatea pacienților evaluați. La pacienții cu țesut adipos excesiv adiponectinemia a fost scăzută. Această constatare se regăsește și în datele din literatură, susținând relevanța valorilor adiponectiniei în evaluarea profilului lipidic al pacienților cu obezitate. Acest fapt se regăsește și în lotul de pacienți pe care l-am evaluat în acest studiu.

➤ În studiul nostru, se constată ponderi ridicate de subiecți cu un risc foarte mare pentru rezistență la insulină, atât în rândul celor cu valori scăzute ale leptinei, cât și în rândul celor cu un nivel normal al leptinei. Nivelul seric al leptinei nu s-a corelat cu severitatea inflamației și a gradului de fibroza hepatică. De asemenea, leptina nu s-a corelat cu evaluarea prin SteatoTest a NASH. Acest lucru sugerează faptul că este necesară o ecuație complexă pentru a determina rolul leptinei în diagnosticul non-invaziv al inflamației din NASH.

➤ În acest studiu, toți pacienții au prezentat valori serice ale Interleukinei-6 peste limita normală. Acest lucru a împiedicat găsirea de corelații cu datele antropometrice sau cu parametrii de injurie hepatică și inflamație. Valorile crescute ale IL-6 în lot se pot explica prin faptul că majoritatea pacienților au prezentat indice de masa corporală și circumferința abdominală cu valori crescute, deci status proinflamator. Nu s-a determinat nivelul intrahepatocitar de IL-6 pentru a stabili corelații cu aspectul histopatologic al NAFLD. În concluzie, IL-6 este o citokină proinflamatoare asociată cu dezvoltarea insulinorezistenței, dar rolul său exact în patogeniza NAFLD încă așteaptă să fie determinat.

➤ În acest studiu, s-au demonstrat corelații semnificative statistic între indicii antropometrici și Adiponectină, dar valorile Leptinei, IL-6 și Apoptosense M30 nu au variat semnificativ în funcție de gradul de fibroză evaluată prin Fibroscan,

Fibromax sau ecografie. Putem deduce de aici că, nici una dintre aceste molecule nu este specifică pentru inflamația din steatoză și că nu putem stabili un diagnostic de certitudine care să înlocuiască proba histologică pe baza determinărilor serologice.

➤ Valorile Fibromax și Fibroscan au fost concludente în evaluarea gradului fibrozei, corelat cu aspectul ecografic. Acest lucru sugerează că acuratețea imagisticii și a ecuațiilor complexe folosind multipli parametri serologici rămâne standardul actual non-invaziv în diagnosticul NAFLD.

Limitările studiului și direcții de cercetare - principala limitare a studiului o constituie numărul mic de pacienți eligibili incluși la care s-au putut determina nivelul seric al markerilor inflamatori. Totodată, efectuarea unui studiu transversal necesită recrutarea de pacienți în diverse grade de evoluție a patologiei studiate și cu diverse afecțiuni, ce ar putea influența nivelurile serice ale parametrilor studiați. Un astfel de studiu transversal ar putea determina diferențe semnificative statistic în expresia moleculelor studiate în patologii variate.

Direcții viitoare de cercetare au la baza lotul actual de pacienți, ce va fi monitorizat conform ghidurilor actuale de diagnostic și management. Se va încerca analizarea periodică a parametrilor biologici și imagistici în funcție de tratamentul urmat și eficacitatea lui. Se va face corelarea acestei analize cu posibilele modificări în valorile markerilor specifici ce acompaniază NAFLD.

În ciuda aparentei lipse de importanță a patologiei steatozice hepatice (fiind un diagnostic suprautilizat), NAFLD impune probleme diagnostice și terapeutice cu importanță deosebită în managementul pe termen lung al pacienților cu sau fără alte patologii. Pe de altă parte, incidența în creștere a sindromul metabolic însoțită de creșterea frecvenței NAFLD în populația generală, face ca această patologie să constituie o cauză importantă de morbiditate și mortalitate în hepatologie. Se remarcă un număr din ce în ce mai mare de pacienți cu ciroza hepatică având ca substrat NAFLD, parte dintre ei devenind candidați pentru transplant hepatic.

Se impun studii ulterioare pentru a caracteriza inflamația hepatică asociată sindromului metabolic în faze precoci, corelată cu aspectul histologic și imagistic. Această necesitate este dictată de nevoia de a determina și valida în studii populaționale un panel minim de teste specifice, sensibile și cost-eficiente pentru diagnosticul și monitorizarea NAFLD/NASH.

BIBLIOGRAFIE

1. Younossi Z, Quentin M, Anstee MQ, Marietti M, Hardy T, Henry L, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*; 2018. (15):11-20
2. Marchesini G, Bugianesi E. NASH as part of the metabolic (insulin resistance) syndrome. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 55-65.
3. Caldwell SH, Hylton AI. The clinical outcome of NAFLD including cryptogenic cirrhosis. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 168-180.
4. Bode C, Bode JC. Steatohepatitis resulting from intestinal bypass. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 241-248.
5. Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2011;14(6):804–810.
6. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013;3(2):785–797.
7. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(6):344–363.
8. Luo DZ, Vermijlen D, Ahishali B, et al. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World J Gastroenterol*. 2000;6(1):1–11.
9. Tsutsumi V, Nakamura T, Ueno T, Torimura T, Aguirre-García J. *Structure and Ultrastructure of the Normal and Diseased Liver*. Liver Pathophysiology Therapies and Antioxidants. Elsevier Inc. 2017; Pages 23-44
10. Tandra S, Yeh MM, Brunt EM, Vuppalanchi R, Cummings WO, Ünalp-Arida A et al. Presence and Significance of Microvesicular Steatosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease *J Hepatol*. 2011; 55(3): 654–659.
11. Li Z, Diehl AM. Cytokines and inflammatory recruitment in NASH: experimental and human studies. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 123-131.
12. Bass NM, Merriman BR. Fatty acid metabolism and lipotoxicity in the pathogenesis of NAFLD/NASH. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 109-122.
13. Day PC, Daly KA. NASH is a genetically determined disease. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 66-75.

14. Leclercq AI, Horsmans Y. Cell biology of NASH: fibrosis and cell proliferation. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 143-158.
15. Seo YY, Cho YK, Bae JC, et al. Tumor Necrosis Factor- α as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013;28(1):41–45.
16. Ionel Copaci, Laurențiu Micu, Grethi Chiriac, Eugenia Mîndruț, Gener Ismail, Luminița Leurzeanu. Immunological and molecular mechanisms în NAFLD. *Journal of Translational Medicine and Research*. 2015; 20(4):206-214
17. Luminița Leurzeanu, Laura Cârstocea. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: What We Need to Know. *Surg. Gastroenterol. Oncol*. 2019;24(2):80-85. Available from: URL: <https://www.sgo-iasgo.com/article/non-alcoholic-fatty-liver-disease-what-we-need-to-now>
18. Finelli C, Tarantino G. What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease?. *World J Gastroenterol*. 2013;19(6):802–812.
19. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* 2011; 17(23): 2801-2811
20. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2014;28(11):607–618.
21. Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Tilg H. Adipokines and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Multiple Interactions. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1649.
22. Huang XD, Fan Y, Zhang H, et al. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(18):2888–2893.
23. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol*. 2016;64(6):1403–1415
24. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2012;18(8):727–735.
25. Stojšavljević S, Gomerčić Palčić M, Virović Jukić L, Smirčić Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18070–18091.
26. Pearce SG, Thosani NC, Pan JJ. Noninvasive biomarkers for the diagnosis of steatohepatitis and advanced fibrosis in NAFLD. *Biomark Res*. 2013;1(1):7.
27. Linder S. Caspase-cleaved keratin 18 as a biomarker for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) - The need for correct terminology. *J Hepatol*. 2011; 55 (6) :1467.
28. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *J Cell Death*. 2016;9:19–29.
29. Samuel TV, Shulman IG. Insulin resistance in NAFLD: potential mechanisms and therapies. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 38-54.

30. Salgado AL, Carvalho Ld, Oliveira AC, Santos VN, Vieira JG, Parise ER. Insulin resistance index (HOMA-IR) in the differentiation of patients with non-alcoholic fatty liver disease and healthy individuals. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(2):165-169
31. Botros M, Sikaris KA. The de Ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev*. 2013;34(3):117–130.
32. Clouston DA, Powell EE. Does NASH or NAFLD contribute to comorbidity of other liver diseases? In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 276-288.
33. Badea R. Ficatul. In: *Tratat de ultrasonografie clinica vol 1*. ISBN 973-39-0411-2. Editori: Badea R, Dudea S, Mircea P, Stamatian F. Editura Medicala Bucuresti; 2007. p: 105-175
34. Lee DH. Imaging evaluation of non-alcoholic fatty liver disease: focused on quantification. *Clin Mol Hepatol*. 2017;23(4):290–301.
35. Reeder SB, Sirlin CB. Quantification of liver fat with magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2010;18(3):337-357
36. George J, Farrell CG. Practical approach to the diagnosis and management of people with fatty liver diseases. In: Farrell CG, George J, Hall MP, McCullough JA, editors. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford (UK): Garsington Road, Blackwell Publishing Ltd; 2005. p: 181-193.
37. Ratziu V, Zelber-Sagi S. Pharmacologic Therapy of Non-Alcoholic Steatohepatitis. In: Stephen A. Harrison, guest editor, Kerry Holland, editor. *Non-alcoholic Steatohepatitis*. Volume 13, number 4: *Clinics in liver disease*. Philadelphia: Elsevier; 2009. p: 667-688
38. Bio Predictive. Available from: URL: <https://www.biopredictive.com>
39. Echosense. Available from: URL: <http://www.fibroscan.com/fr/>
40. Popa M. Statistică pentru psihologie. Teorie și aplicații SPSS, Editura Polirom: Iași; 2008. p.141
41. Dumitru DL. Bazele Marketingului. Vol. 1. Editura Casa Cărții de Știință: Cluj-Napoca; 2001. p.236
42. Labăr AV. SPSS pentru științele educației, Editura Polirom: Iași; 2008. p.109
43. Rateau P, Metodele și statisticile experimentale în științele umane. Editura Polirom. 2004. p.191