

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN: " NUOVI SISTEMI DI VALUTAZIONE E STUDIO DELLE COMPLICANZE EMODINAMICHE E METABOLICHE DELLE EPATOPATIE CRONICHE"

XXIV CICLO

TESI DI DOTTORATO

IMMUNOLOCALIZZAZIONE EPATICA E LIVELLI PLASMATICI DI MMP-9 NELL 'EPATITE C CRONICA E NELLA STEATOEPATITE NON ALCOLICA

COORDINATORE : CH.MO PROF. GAETANO BERTINO

RELATORE: CH.MO PROF. SERGIO NERI

DOTTORANDO: DR. LUCA IGNACCOLO

Introduzione

La risposta epatica agli stress di diversa eziologia costituisce il comune denominatore ed il cardine intorno a cui ruota il grande capitolo delle epatiti croniche.

L'identificazione di marcatori specifici correlabili all'evoluzione dell'epatite, dunque alla prognosi, è un target verso il quale la ricerca scientifica tende nell'intento di una efficace prevenzione del decorso clinico. Nel presente studio prendiamo in considerazione due malattie epatiche croniche responsabili di fibrosi: l'epatite cronica da virus C (Chronic Hepatitis C- CHC) e la NASH (non alcoholic steatohepatitis). La steatosi epatica consiste in un accumulo di grasso, principalmente sotto forma di trigliceridi, in una quantità superiore al 5% del peso del fegato. L'associazione di una steatosi epatica con lesioni istologiche caratterizzate da flogosi, necrosi, fibrosi [1] d'intensità variabile realizza il quadro definito della NASH. Le lesioni sono simili a quelle della malattia alcolica del fegato (alcoholic fatty liver diseases - AFLD), ma si presentano in assenza di un consumo eccessivo di alcool. Steatosi semplice (Non Alcoholic Fatty Liver Disease- NAFLD) e NASH (forma flogistica-fibrosante con possibile progressione in cirrosi) [2] sono le principali forme anatomo-cliniche della NALFD. Studi prospettici e probabilistici segnalano come probabilmente queste affezioni, dopo le forme alcoliche e virali, occuperanno in un prossimo futuro una parte sempre più importante della patologia epatica.

La steatoepatite non alcolica (NASH) [3] rappresenta una forma progressiva di malattia epatica ad esito fibrotico [1], causata da un persistente stato infiammatorio provocato a sua volta da un insulto cronico ad eziologia ancora non completamente conosciuta.

La sua prevalenza aumenta costantemente nel mondo. Circa il 10% dei pazienti con NAFLD evolve in NASH che a sua volta può progredire in cirrosi con morte per cause epatiche ed epatocarcinoma rispettivamente nel 25%, 10% e 1% dei casi (5-7). La NAFLD sembra comunque essere a lenta progressione, con una minoranza di pazienti affetti che presenterà morbilità e morbidità patologia-correlata [4]. Diversi studi hanno suggerito che lo stress ossidativo può avere un ruolo importante nella patogenesi della NASH sebbene molti quesiti rimangano senza risposta. [5] La patogenesi della NAFLD non è stata ancora dunque del tutto chiarita. Non è chiaro perché alcuni pazienti sviluppino un semplice steatosi epatica mentre altri manifestino progressione dalla steatosi alla fibrosi epatica ed eventualmente fino alla cirrosi. Dagli studi longitudinali i principali fattori di rischio per la progressione a fibrosi sono l'età, l'insulino-resistenza e le patologie ad essa correlate (diabete, obesità, ipertrigliceridemia) [6]. Nelle fasi avanzate vi è una sovrapposizione tra causa (insulino-resistenza) ed effetto (fibrosi), la cirrosi infatti induce di per sé insulino-resistenza [7]. L'insorgenza e la progressione della fibrosi è più frequente tra i pazienti con steatoepatite rispetto a semplice steatosi.

Alcuni Autori propongono che l'insulino-resistenza svolga un ruolo chiave portando alla steatosi epatica da una parte e dall'altra facilitando la progressione in steatoepatite. Altri autori hanno proposto la teoria dei "due colpi".

L'eziopatogenesi della NASH [8] sembra comunque essere multifattoriale a mezzo di un duplice insulto che coinvolge gli epatociti, in prima battuta (primo

"hit") con l' insorgenza di una steatosi macrovescicolare (risultante dall' accumulo di grasso dentro l' epatocita) ed in secondo luogo (secondo "hit"), a causa dello sviluppo di uno stato di stress ossidativo, con la perossidazione della membrana lipidica dell' epatocita il rilascio di citochine proinfiammatorie e attivazione delle cellule stellate. Il deposito di ferro a livello epatico, la leptina, la sovracrescita batterica ed il calo delle difese anti-ossidanti sono stati studiati come possibili agenti ossidativi.

Ruolo dell'insulino-resistenza

L'insulino-resistenza induce cambiamenti importanti nel metabolismo lipidico quali un aumento della lipolisi periferica, aumentata sintesi di trigliceridi e aumentata captazione (uptake) di acidi grassi da parte del fegato [9] . Tutte queste condizioni contribuiscono all'accumulo di trigliceridi nell'epatocita. I trigliceridi derivano dagli acidi grassi accumulati nel tessuto adiposo e dalla lipogenesi de novo che avviene a livello epatico. Normalmente, gli acidi grassi vengono esterificati a livello epatico in trigliceridi, alcuni dei quali sono poi trasportati fuori dagli epatociti come very-low-density lipoproteins (VLDL). L'aumento dei livelli di lipidi (in particolare sotto forma di trigliceridi) all'interno delle cellule epatiche di pazienti con NAFLD risulta da uno squilibrio tra gli enzimi che promuovono l'entrata e la sintesi di acidi grassi e quelli che promuovono l'ossidazione e l'uscita degli acidi grassi[10]. L'insulino-resistenza (stimolata da TNF α , Rad, PC-1, leptina e acidi grassi) porta ad un accumulo di grasso nel fegato con due sistemi: la lipolisi e l'iperinsulinemia. La lipolisi induce un aumento della quantità di acidi grassi liberi nel sangue provenienti dal tessuto adiposo e di conseguenza un aumento dell'uptake epatico di acidi grassi. L'aumento degli acidi grassi a livello degli epatociti porta ad uno shift tra l'ossidazione dei carboidrati e la β -ossidazione degli acidi grassi, una

saturazione della β -ossidazione comporta un accumulo intraepatico di grasso. Gli acidi grassi sono inoltre substrati e induttori dei citocromi P450 (in particolare 2E1 e 4A). Quest'ultimo tende ad essere elevato nei pazienti con NAFLD e porta ad un aumento dei radicali liberi dell'ossigeno capaci di indurre la perossidazione dei lipidi di membrana. L'iperinsulinemia (secondaria all'insulino-resistenza) induce a livello epatico un aumento della glicolisi e successiva conversione dei carboidrati in FFA (trigliceridi) e favorisce l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti in quanto porta ad una aumentata distruzione della proteina B-100, essenziale per la costituzione delle VLDL.

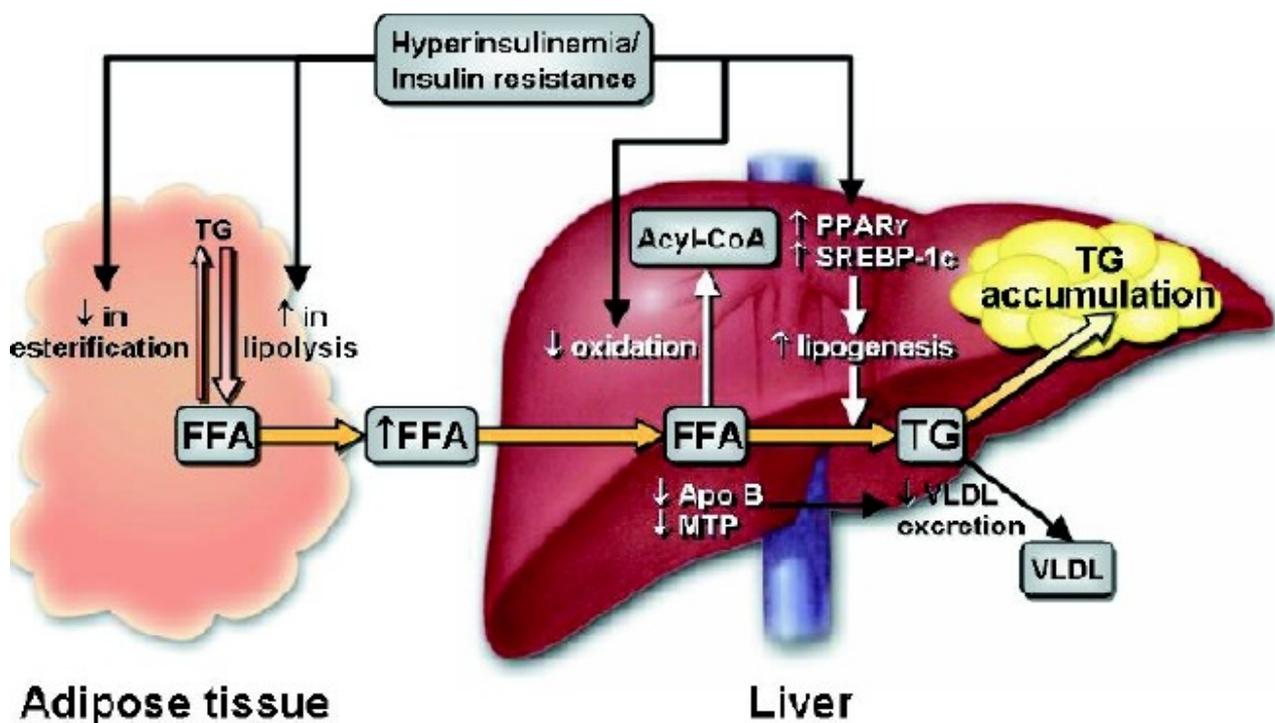


Figura 1: Ruolo dell'insulino-resistenza nella steatosi epatica. L'insulino-resistenza a livello del tessuto adiposo stimola la lipolisi e inibisce l'esterificazione degli acidi grassi liberi (FFA), questo determina un'aumentata concentrazione sierica di FFA che vengono captati dal fegato e utilizzati per la sintesi di trigliceridi. L'iperaccumulo di trigliceridi nel fegato è secondario all'aumentato afflusso di FFA e all'iper-espressione di fattori di trascrizione lipogenici (PPAR γ -peroxisome proliferator-

activated receptor gamma e SREBP1c-sterol regulatory element binding protein). L'iperinsulinismo inoltre inibisce l'ossidazione degli FFA e lo smaltimento dei trigliceridi sotto forma di VLDL per ridotta sintesi di apo B o ridotta incorporazione di trigliceridi con apo B da parte di MTP-microsomal triglyceride transfer protein. (tratto da Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. CMAJ. 2005;172(7):899-905.) [9].

Ruolo dello stress ossidativo [11]

L'accumulo di grasso negli epatociti provoca saturazione della β -ossidazione mitocondriale (l'iperinsulinemia stessa è in grado di bloccare la β -ossidazione mitocondriale). Quindi se c'è un aumentato afflusso di acidi grassi diventano importanti i sistemi extra-mitocondriali di ossidazione: β -ossidazione perossisomiale (in genere deputata all'ossidazione di acidi grassi a catena molto lunga) e la ω -ossidazione microsomiale (ad opera degli enzimi 2E1 e 4 del citocromo P450 con produzione di acidi grassi dicarbossilici particolarmente tossici per la cellula); entrambe determinano la liberazione di H_2O_2 ed altre specie reattive dell'ossigeno. Le lipossigenasi perossisomiali e microsomiali di questi processi extramitocondriali sono regolate da particolari recettori cellulari PPAR α (dopo il loro legame con gli Acil-CoA non metabolizzati). L'accumulo intraepatocitario di acidi grassi rappresenta una fonte di stress ossidativo responsabile dell'evoluzione da semplice steatosi alla steatoepatite e alla cirrosi.

Quando le specie reattive dell'ossigeno superano le capacità difensive dei sistemi antiossidanti possono indurre steatoepatite e fibrosi tramite perossidazione lipidica e induzione di citochine. L'iperproduzione di specie reattive può indurre danno a livello mitocondriale (danno al DNA, alle proteine ed alle membrane costitutive) con alterazione della produzione cellulare di ATP e rilascio ulteriore di metaboliti reattivi dell'ossigeno. La perossidazione lipidica delle membrane cellulari provoca

necrosi cellulare, formazione della sostanza ialina di Mallory ed attivazione delle cellule epatiche stellate che sintetizzano collagene. Lo stress ossidativo induce la formazione di citochine come il TNF α , TGF β e IL8 [12, 13, 14] da parte di epatociti, cellule di Kupffer e adipociti. Queste citochine provocano apoptosi, chemiotassi leucocitaria, fenomeni di flogosi locale con ulteriore danno alla catena respiratoria mitocondriale. I mitocondri in corso di steatoepatite presentano danni ultrastrutturali con inclusioni paracrystalline e megamitocondri. I mitocondri sono strutture intracellulari fondamentali per il metabolismo che servono per la produzione di energia della cellula. È stato dimostrato che anomalie mitocondriali sono fortemente legate alla patogenesi della NAFLD e tali dati supportano la teoria che la NAFLD sia una malattia mitocondriale [15]. La disfunzione mitocondriale però non è solo causa di accumulo di grasso a livello epatico, ma porta anche alla generazione di ROS e di citochine che contribuiscono alla progressione della NAFLD inducendo infiammazione e fibrosi epatica.

STEATOSI

↑ FFA

Insulino resistenza:
resistenza alla Leptina
obesità
ipertrigliceridemia
≅ funzione VLDL

STEATOEPATITE

STRESS OSSIDATIVO / PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

DISFUNZIONE MITOCONDRIALE

DISFUNZIONE KUPFFER CELLS

- ↓ ATP sintesi
- ↑ UCP-2
- ↓ -ossidazione

ADATTAMENTO EPATOCITI

- ↑ effetto endotossine
- ↑ Attività patogenetica
- Alterato profilo citochine

TGF  - PDGF - CTGF

Apoptosi

Flogosi

Necrosi

Cellule stellate

Fibrosi

Ruolo delle adipochine e delle citochine infiammatorie

Il tessuto adiposo è un organo endocrino attivo che secreta le adipochine che sembrano avere un ruolo importante come legame patogenetico tra obesità, insulino-resistenza e steatosi epatica. Il ruolo delle adipochine e delle citochine sembra centrale inoltre nella progressione della steatosi, verosimilmente mediata dallo stress ossidativo. Un ruolo fondamentale di tali molecole è stato evidenziato anche nella genesi dell'aterosclerosi.

Non sono però univoci i risultati dei vari studi che hanno valutato le correlazioni tra le diverse adipochine/citochine con i quadri patologici su menzionati.

La leptina è un sensore di massa grassa, viene codificato dal gene *ob*, è prodotta principalmente dal tessuto adiposo e si lega ai recettori ipotalamici con effetto anoressizzante e termogenico. La leptina previene l'accumulo lipidico nei tessuti non adiposi quali miocardio, muscolo scheletrico, fegato e pancreas attraverso la modulazione della β -ossidazione [16, 17]. Le concentrazioni plasmatiche di leptina sono correlate positivamente con il grado di obesità sia totale sia viscerale; vi è comunque ampia oscillazione dei livelli anche a parità di massa grassa [18]. La leptinemia è maggiore nelle femmine indipendentemente dall'adiposità. Il metabolismo della leptina è in relazione con la secrezione e l'azione dell'insulina; spesso vi è resistenza all'azione sia dell'insulina sia della leptina che comporta accumulo di trigliceridi a livello epatico. L'infusione di leptina nei topi riduce il grasso viscerale e l'accumulo di trigliceridi, promuove l'azione insulinica a livello epatico senza interferire con la concentrazione di FFA e con la captazione periferica del glucosio [19]. Questi effetti benefici non dipendono solamente dall'aumento dell'insulino-sensibilità, ma anche dall'azione della leptina in sé. A seconda degli

studi i livelli di leptina sono stati descritti come aumentati [20] o diminuiti nei pazienti con NAFLD. L'iperleptinemia che si riscontra nei pazienti con NAFLD sembra secondaria alla leptino-resistenza nei tessuti periferici [21]. E' stato dimostrato inoltre che la leptina potrebbe avere un effetto profibrogenico a livello dei sinusoidi favorendo la progressione della steatosi in fibrosi [22]. In pazienti obesi e diabetici tipo 2 i livelli di leptinemia sono risultati ridotti se confrontati con quelli di pazienti solo obesi con simile grado di insulino-resistenza; tale risultato sembra quindi essere correlato non all'obesità o insulino-resistenza ma alla ridotta e alterata pulsatilità fisiologica della secrezione insulinica [23]. Uno studio coreano ha evidenziato che il grado di steatosi (determinato ecograficamente) correla con i livelli di leptina, non vi è invece relazione con adiponectina e resistina [24]. Diversi invece i risultati di un recente studio spagnolo che ha correlato i gradi di steatosi (determinati istologicamente) con le adipochine e l'insulino-resistenza; l'adiponectina e la resistina correlano con la steatosi, non si rileva invece aumento di leptina e TNF α all'aumentare dell'entità della steatosi [25]. E' stato evidenziato dal confronto di pazienti grandi obesi con e senza insulino-resistenza che in quelli con insulino-resistenza vi era una riduzione di adiponectina e un aumento della resistina, non vi erano invece differenze per la leptina [26].

Ruolo delle MMP9

Le metallo proteinasi (MMP) [27, 28, 29] sono una famiglia di endopeptidasi zinco dipendenti che sembrano essere coinvolte nei processi di rimodellamento della matrice extracellulare, nella fibrogenesi e nella carcinogenesi , [4] prevalentemente prodotte da cellule del tessuto connettivo e secreti nella matrice extracellulare. Queste proteine insieme sono capaci di degradare la maggior parte, se non tutte, le componenti della MEC. Esse risultano attive nei

processi fisiologici e patologici che coinvolgono il rimodellamento del tessuto. Il rimodellamento della MEC è infatti parte integrante della normale crescita e differenziazione tissutale, così come, nei processi patologici, è coinvolto nella distruzione di tessuto e nella crescita abnorme di esso. E' per questo che risultano coinvolte in numerosi processi fisiologici di rimodellamento tissutale, associati alla crescita ed allo sviluppo (soprattutto durante la vita intrauterina). Inoltre prendono parte a vari meccanismi patologici causa di artrosi (dovute alla distruzione del tessuto) e responsabili della formazione di metastasi (risultato invece di un suo sviluppo abnorme).

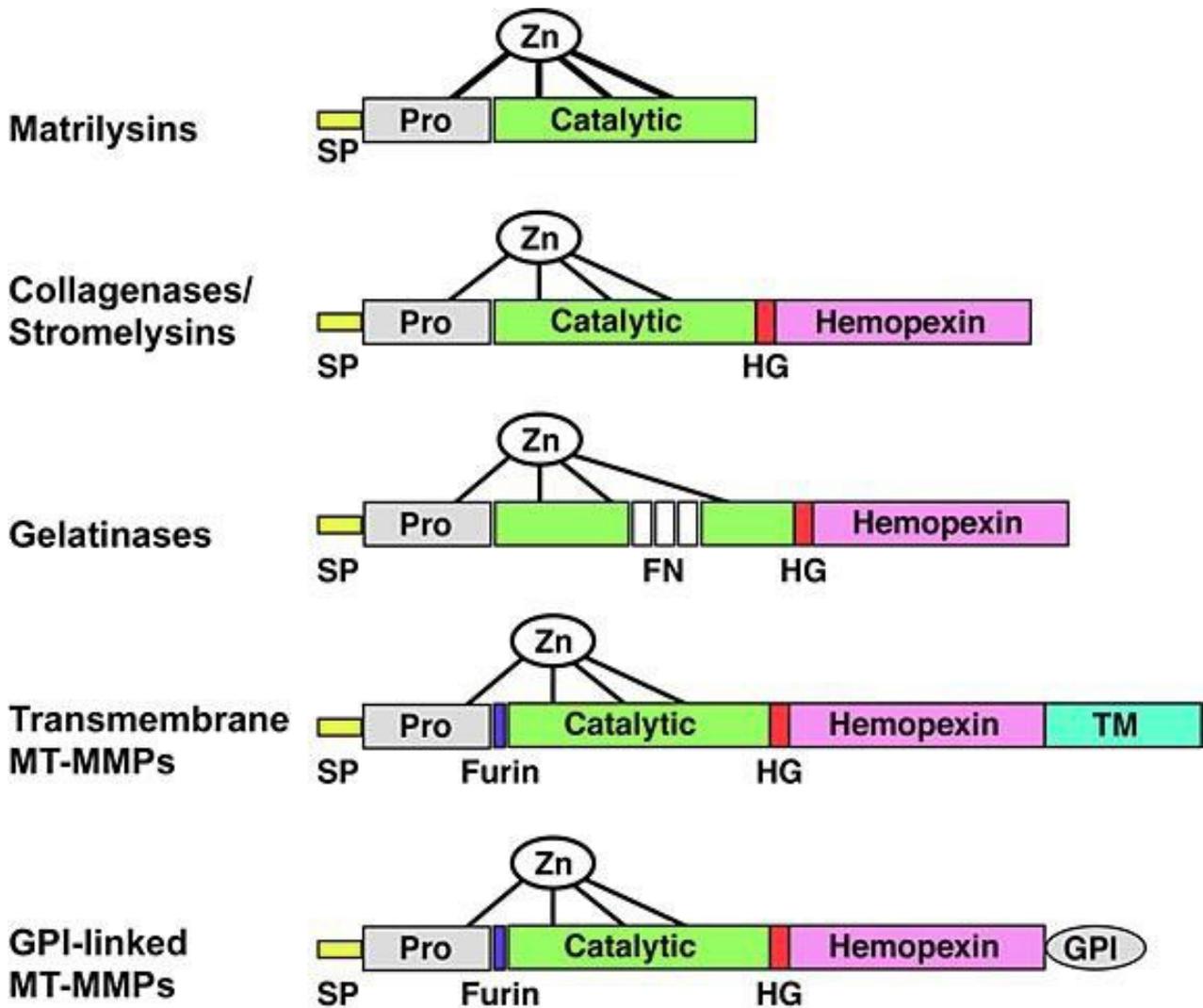
La loro espressione è regolata a livello trascrizionale da mediatori infiammatori, tra cui le citochine e diversi fattori di crescita: appare quindi evidente uno stretto legame tra infiammazione e MMP. Ad eccezione delle metalloproteasi di membrana (MT MMP) che sembrano essere attivate primariamente dall'interazione con la membrana cellulare, esse sono secrete come proenzimi e necessitano di attivazione extracellulare per esacerbare l'attività proteolitica. Una volta attivate, le MMP possono essere inibite da un'altra famiglia di proteine, gli inibitori tissutali delle MMP (TIMP), anch'essi largamente distribuiti nei tessuti. Questa famiglia viene suddivisa, in base all'efficienza della proteolisi ed alla composizione in domini, in quattro classi: gelatinasi (MMP-2, MMP-9), collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelisine (MMP-3, MMP-10, MMP-12) e metalloproteasi di membrana (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP)

MMP-1, 8, 13, 18	Collagenasi	Attività collagenolitica su colagene di tipo I, II e III
MMP-2, 9	Gelatinasi	Attività collagenolitica, degradazione di laminina, gelatina e fibronectina. Responsabili dell'attivazione di molte citochine e di altre MMP.
MMP-3, 10	Stromalisine	Degradazione di collagene, fibronectina, laminina, caseina e altre MMP.
MMP-7, 26	Matrilisine	Degradazione di diverse componenti della matrice e di molecole di superficie come l'E-caderina.
MMP-14 (MT1 MMP) MMP-15 (MT2 MMP) MMP-16 (MT3 MMP) MMP-17 (MT4 MMP) MMP-24 (MT5 MMP) MMP-25 (MT6 MMP)	Metalloproteasi di membrana (Membrane-Type MMP)	Proteine transmembrinarie coinvolte nel meccanismo di attivazione di altre MMP.
MMP-11, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 28	Altre metalloproteasi	Difficile classificazione. Tipicamente espresse in un singolo tessuto o in particolari condizioni

La MMP9 (gelatinasi B; 92 kDA type IV collagenasi) [30, 31, 32] e' capace di degradare le gelatine di tipo III, IV, V e di clivare altre molecole sia della matrice e non appartenenti alla matrice con rilascio conseguente di molecole bioattive. [33]

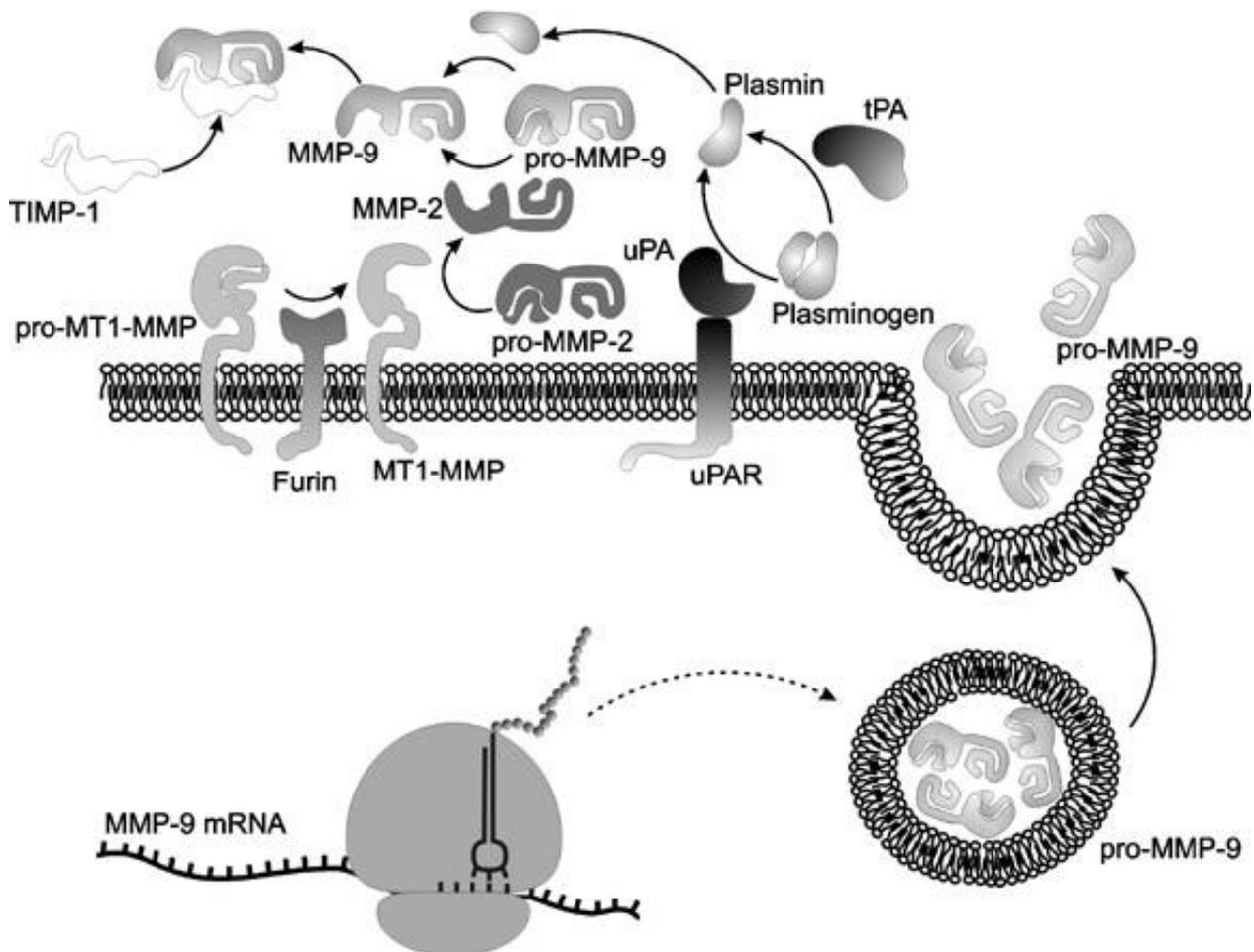
Una tipica metalloproteasi è costituita da un prodominio di circa 80 aminoacidi, un sito catalitico di circa 170 aminoacidi, un peptide *linker* di variabile lunghezza (detto *hinge region*) ed un dominio *hemopexin-like* di circa 200 aminoacidi. La proteina viene secreta nella sua forma inattiva (pro-MMP), nella quale l'atomo di zinco presente nel sito catalitico non è disponibile alla formazione di legami per la presenza di una cisteina. L'attivazione deriva quindi dall'esposizione del sito catalitico, che può così interagire con i substrati. L'attivazione può essere di due

tipi, enzimatica o non enzimatica: nel primo caso avviene per azione di enzimi proteolitici, fra i quali plasmina o altre MMP.



Struttura delle metalloproteasi. Abbreviazioni: SP, peptide segnale (sequenza di secrezione); Pro, prodominio; Catalytic, sito catalitico; FN, dominio *fibronectin-like*; HG, *hinge region*; TM, dominio transmembrana; GPI, glycosylphosphatidylinositol anchor; Zn, atomo di zinco. Alcune MMP presentano un sito di clivaggio di tipo furinico (Furin) tra il prodominio e il sito catalitico.

L' MMP-9 viene attivata *in vitro* da svariati enzimi proteolitici. *In vivo* l'attivazione è correlata a una cascata di eventi che coinvolgono altre MMP, tra cui la MMP-14, MMP-2, MMP-3 e il sistema della plasmina. La plasmina è rilasciata sotto forma di plasminogeno; quest'ultimo è attivato dall'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) fibrino-associato e dall'attivatore del plasminogeno tipo urochinasico (uPA) legato al suo specifico recettore di membrana (uPA receptor). Sia tPA sia uPA sono associati alla membrana e creano così un'attivazione localizzata della pro-MMP e il conseguente *turnover* della MEC. Una volta attivata, MMP-9 viene rapidamente inattivata dal suo inibitore tissutale, TIMP-1.



Meccanismo di sintesi, attivazione e inibizione della pro-MMP-9. TIMP-1, inibitore tissutale delle metalloproteasi di matrice-1; MMP, metalloproteasi di matrice; MT, membrane-type; tPA, attivatore tissutale del plasminogeno; uPA, attivatore del plasminogeno tipo urochinasico ; uPAR, recettore dell'uPA

Contributo personale

Nello studio realizzato in collaborazione con l'ISMETT di Palermo e la Divisione di Medicina Generale Di Luino noi abbiamo analizzato l' espressione e la localizzazione della MMP9 in pazienti con NASH, e con epatite da virus C (HCV), una altra condizione che, se cronicizzata, può indurre fibrogenesi nel parenchima epatico. [34]

Il nostro obiettivo principale e' stato quello di studiare la possibile utilità diagnostica di questa metallo proteinasi quale marker di fibrogenesi nei pazienti con epatite cronica.

Materiali e metodi

Dal Gennaio 2010 al Settembre 2011, è stato arruolato nello studio un totale di 44 pazienti con NASH (di età' compresa tra $39,4 \pm 8,1$ anni di cui 18 femmine e 26 maschi) e 44 soggetti con epatite cronica da virus C (CHC) (età 37.1 ± 10 , di cui 19 femmine e 25 maschi) con valori sierici elevati di transaminasi. Come controlli, sono stati arruolati 40 soggetti sani (20 maschi e 20 femmine) con un range di età di 25 - 60 anni.

I pazienti con NASH sono stati ammessi o inviati al nostro dipartimento per riscontro occasionale dell'elevazione degli enzimi epatici.

Tutti i controlli erano negativi per i markers dell' epatite e presentavano una normalità dei maggiori valori emato-chimici.

L' infezione HCV e' stata diagnosticata e confermata con PCR (Amplicor quantitative protein Chain reaction system. Roche Diagnostic System Inc, Bracburg NJ , USA.).

Per escludere altri possibili fattori che causano fibrosi, i soggetti con epatite B (identificati tramite HBV- DNA), Epstein-Barr virus (EBV), e citomegalovirus (CMV), carcinoma epatocellulare, cirrosi biliare primitiva, epatite alcolica, malattie autoimmuni, emocromatosi, porfirie, abuso di droga e sieropositività all' HIV sono stati esclusi dallo studio.

Per ragioni statistiche, abbiamo escluso soggetti con infezione diversa da quella causata dal sierotipo 1b in quanto nel nostro Paese l'etiologia virale da virus C riguarda quasi totalmente il ceppo 1b.

Pazienti dislipidemici o con un indice di massa corporeo maggiore di 30 ed i fumatori sono stati anche stati esclusi.

Le condizioni di CHC e NASH sono stati definitivamente diagnosticate in tutti i pazienti tramite esame istologico eseguito su frustoli epatici prelevati mediante biopsia transcutanea nei soggetti con evidenza ecografica di steatosi ed elevati valori di transaminasi in modo da identificare i sospetti per NASH.

I campioni di biopsia epatica sono stati considerati appropriati per l' esame istologico qualora fossero presenti almeno 6 spazi portali. Le diagnosi istologiche sono state eseguite da un solo patologo su sezioni fissate con ematossilina - eosina , tricromi Masson, blue di Prussia e Acido periodico di Schiff piu' diastasi; immunocolorazione con Alfa - 1 anti tripsina e' sta utilizzata per escludere depositi di Alfa 1 antitripsina. I prelevati sono stati fissati in formaldeide neutra tamponata al 4 % per un minimo di 24 ore e poi incorporati in paraffina . Le biopsie epatiche sono state eseguite per

confermare la diagnosi di epatopatia cronica C . Le diagnosi istologiche sono state fatte dallo stesso epatologo su sezioni fissate con ematossilina-eosina.

L ' attivita' infiammatoria (di grado da uno a quattro, G1- G4) [35, 36, 37] e il grado di fibrosi (di grado da uno a quattro S1 – S4) sono state determinate sulle biopsie secondo la scala numerica di Scheuer.

Un fegato grasso (NAFLD) e' stato definito dalla presenza di steatosi con o senza infiammazione. Una diagnosi istologica di NASH ha richiesto la presenza di steatosi, di infiammazione lobulare e di degenerazione epatocitica balloniforme, degenerazione epatocitaria con o senza fibrosi perisinusoidale e corpi ialini di Mallory.

LESIONI ISTOPATOLOGICHE NELLA NASH

1. *Frequentemente descritte*

- *Steatosi macro > micro*
- *Infiammazione lobulare di grado lieve; cellule polimorfonucleate e monociti*
- *Degenerazione balloniforme epatocitaria*
- *Necrosi epatocellulare*

2. *Descritte con frequenza variabile*

- *Fibrosi perisinusoidale ed eventualmente a ponte centro-portale*
- *Nuclei glicogenati*
- *Lipogranulomi*
- *Corpi di Mallory*
- *Accumuli di ferro periportali*

3. *Non caratteristiche*

- *Steatosi puramente o prevalentemente microvescicolare*
- *Necrosi ialina*
- *Lesioni veno-occlusive*
- *Infiammazione portale > lobulare*
- *Fibrosi portale/periportale in assenza di fibrosi perisinusoidale*
- *Colestasi cronica (lesioni duttali o perdita di dotti)*

La steatosi, l'attività flogistica, la fibrosi sono state determinate sui campioni biotici secondo i criteri standard da un unico patologo esperto nel campo della diagnostica epatologica.

I test ematici di funzionalità epatica e altre misurazioni biochimiche nel sangue sono state eseguite la mattina dopo 12 ore di digiuno continuativo, utilizzando procedure standard di laboratorio.

L'ecografia epatica è stata eseguita di routine prima della biopsia epatica; l'epatosteatosi è stata confermata tramite l'utilizzo di sonda ecografica convessa lineare ad alta risoluzione (7, 8 Mhz; Acuson corporation, Mountain View, CA, USA). Le scansioni sono state eseguite secondo i criteri convenzionali, da due operatori esperti che non conoscevano le caratteristiche cliniche e di laboratorio dei soggetti in esame

L'introito alcolico (giornaliero o medio) è stato determinato in una intervista eseguita dal medico di riferimento e dai familiari secondo i protocolli stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per l'identificazione dell'abuso alcolico. [38]

Il diabete è stato diagnosticato secondo i criteri dell'Associazione Americana del Diabete.

La dichiarazione di Helsinki sulla sperimentazione umana è stata rispettata in tutti i suoi aspetti.

Determinazione plasmatica dei livelli di MMP 9. Le concentrazioni plasmatiche di MMP9 [39] sono state misurate con metodica ELISA (Human biotrack Elisa Assay, Amersham, GE Healthcare). Il plasma è stato diluito 1 : 20 prima della processazione del tessuto.

Immunoistochimica. Per il riscontro degli antigeni, sezioni dello spessore di 5 µm sono state riscaldate con microonde per 15 minuti in un tampone di citrato in 10 mM (pH 6.0). Poi le sezioni sono state trattate con perossido d' idrogeno 1 % per 15 minuti e susseguentemente incubate con siero di fissaggio a diluizione normale per 20 minuti a temperatura ambiente. Poi le sezioni sono state incubate con anticorpi policlonali primitivi anti-MMP9 di coniglio (diluizione 1:150, AB13458, Chemicon International Inc. Temeculo, CA ; USA) per due ore a temperatura ambiente. Il rilevamento e' stato eseguito utilizzando il sistema complesso streptavidina - biotina - perossidasi (immunoCruz™ Staining System) (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) , in accordo alle istruzioni della casa farmaceutica. In fine le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Mayer. Il preparato e' stato disidratato, montato e osservato con microscopio a luce convenzionale. Le sperimentazioni dei controlli negativi sono stati eseguite sostituendo l' anticorpo primario con un siero non immune e omettendo l' anticorpo primario, poi incubando i preparati solo nel tampone.

Analisi delle immagini. Le sezioni dei campioni, etichettati e randomizzati sistematicamente, sono stati osservati con microscopio Leicas DMRB (Leica , Wetzlar, Germany) e fotografati con fotocamera Canon G – 9 (Canon, Japan). Tutte le immagini sono state ottenute utilizzando un obiettivo a 40 X. Sono stati analizzati un totale di 40 campi, utilizzando un software di immagini J (versione 1.42 g) [40]. L' intensita' di colorazione dell' MMP9 e' stata analizzata con un plug-in di colour deconvolution [41]. In seguito, la frazione di

area immunocolorata e' stata utilizzata (area percentuale) in accordo alla seguente formula: $f_a = \frac{\sum s_a}{\sum A}$, dove S_a e' l' area colorata, A e' l' area totale del campo d' immagine.

Analisi statistica

Le differenze dei livelli plasmatici di MMP9 tra i sottogruppi dei pazienti sono stati determinate tramite t-Student test. I dati sono stati presentati come valore \pm deviazione standard. Per l'analisi semiquantitativa immunoistochimica, la comparazione statistica delle aree di densita' e' stata eseguita utilizzando ANOVA unidirezionale. Le differenze con entrambe le tecniche sono state considerate essere statisticamente significative ad un livello di $p < 0,05$.

La valutazione statistica e' stata eseguita con il SPSS 11.0 (Statistical Packages for Social Sciences; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

Risultati

Determinazione dei livelli plasmatici di MMP-9

Il valore medio di MMP-9 nei controlli sani era di 39.7 ± 4.6 ng / ml. I pazienti HCV positivi mostravano un valore medio di MMP-9 aumentato in rapporto ai controlli sani, raggiungendo un valore di 61.7 ± 9.0 ng / ml ($p < 0.05$). I pazienti con NASH mostravano un valore medio di MMP-9 più alto (69.0 ± 3.8 ng / ml) in rapporto sia ai controlli sani ($p < 0.001$) che ai pazienti con CHC ($p < 0.05$).

Riscontri immunoistochimici. L'esame immunoistochimico eseguito sui pezzi istologici prelevati mediante biopsia, evidenziava che, nei fegati infettati dall'HCV, la proteina MMP-9 era prevalentemente localizzata sui canalicoli biliari e nel citoplasma dell'epitelio dei dotti biliari. [42, 43] Nei campioni istologici prelevati da soggetti affetti da NASH, la MMP-9 era prevalentemente localizzata sul citoplasma dei neutrofili, che erano presenti in numero più elevato rispetto ai campioni portatori di infezione virale, dove i neutrofili rappresentavano un referto occasionale; inoltre, sempre nei pazienti con NASH, i neutrofili [44] presenti avevano una localizzazione periportale mentre nei soggetti con CHC, i pochi neutrofili presenti si concentravano negli spazi sinusoidali.

Per quanto riguarda la MMP9, l'analisi semiquantitativa delle reazioni immunoistochimiche eseguite, evidenziava una concentrazione pressochè simile della proteasi in entrambi i tipi di preparato, provenienti da pazienti con NASH e da pazienti con CHC.

Discussione

Un incremento di MMP9 (ma anche di MMP-2 e MMP-7) e' stata già descritto nei pazienti cirrotici ad eziologia prevalentemente virale.

Nel presente studio, abbiamo investigato i livelli plasmatici e l' immunolocalizzazione di MMP-9 nelle biopsie epatiche dei pazienti affetti da NASH ed epatite cronica C.

Le MMP sono generalmente espresse a basso titolo nei fegati normali e le variazioni ematiche ed intraepatiche sono state correlate allo stadio di fibrosi dei fegati infetti da HCV. [45, 46, 47, 48].

L' espressione di MMP-9 in patologie che inducono fibrosi epatica e' stata investigata in alcuni studi [49, 50, 51, 46].

Nel nostro studio, il plasma dei pazienti con NASH ha mostrato un significativo incremento di MMP-9 comparato ai controlli sani e ai pazienti con CHC concordando così con alcuni autori che hanno dimostrato un incremento dei valori di MMP-9 nei pazienti infetti da HCV e NASH [48, 50, 51, 46].

Nella nostra ricerca l' immunolocalizzazione di MMP-9, ha dimostrato una differenza nei modelli di immunotipizzazione tra NASH e HCV; infatti i campioni HCV infetti hanno mostrato localizzazione nel citoplasma degli epatociti, canalicoli biliari e dotti biliari mentre nei preparati di fegato con NASH, le immunolocalizzazioni di MMP-9 [60], nei campioni immunotipizzati, erano localizzate nei neutrofili; cio' può indicare che questa sottopopolazione cellulare e' un importante sorgente di MMP-9 quantomeno nei pazienti affetti da NASH.

Le cellule infiammatorie, inclusi i neutrofili, costituiscono un importante sorgente di proteasi nei tessuti con flogosi acuta o cronica [52,53] . La presenza di MMP-9 ben rappresentata sui neutrofili di fegati affetti da NASH potrebbe essere spiegata dal fatto che dal letto ematico queste cellule hanno aderito alle cellule endoteliali, trasmigrato attraverso il collagene di tipo IV e raggiunto il parenchima sede della flogosi così come avviene ad esempio nei tessuti cerebrali colpiti da ictus con il doppio scopo di difesa e di rigenerazione [54, 55, 56, 57] .

Nel presente studio abbiamo cercato di indentificare le possibili differenze di espressione delle proteinasi e in particolare della MMP9, nelle fibrosi epatiche a differente etiologia, virale e non virale.

I nostri risultati sembrano dimostrare un significativo aumento dell'espressione della MMP 9 nella steatoepatite non alcolica rispetto all'epatite cronica da virus C.

Recentemente si e' posto enfasi sull' investigazione del ruolo delle metallo proteinasi, le quali possono degradare quasi tutti i componenti della matrice extra cellulare e della lamina basale quali ad esempio laminina, fibronectina o collagene tipo IV (indebolendo così il microcircolo cerebrale e predisponendolo alla rottura e incrementando così il rischio di emorragia cerebrale negli studi effettuati sul tessuto cerebrale). Nei topi e negli umani le ricerche sul sangue periferico hanno dimostrato alti livelli di concentrazione di MMP-9 nei pazienti con ictus ischemico ed elevati livelli di MMP-9 correlati ad un outcome neurologico piu' infausto, con crescita dell' infarto e trasformazione emorragica dimostrando inoltre che l' infiltrato di neutrofili provenienti dal sangue e' un importante sorgente di MMP-9 nelle aree ischemiche.

Nel nostro studio, i neutrofili che producono citochine chemotattiche anormali potrebbero avere reclutato sia i neutrofili presenti nel fegato che quelli provenienti dalla circolazione portale e sistemica e questi neutrofili potrebbero aver prodotto radicali liberi (ROS) che hanno contribuito allo sviluppo della NASH secondo la teoria del doppio "hit".

Sebbene noi ammettiamo che questo scenario sia prevalentemente basato su nostre deduzioni, crediamo che sia ragionevole concludere che l'abnorme funzionamento dei neutrofili possa essere responsabile di severo danno epatico.

In effetti, studi effettuati sulla steatoepatite alcolica, hanno ipotizzato e in parte dimostrato come l'eccesso di endotossinemia riscontrabile negli alcolisti cronici, possa condurre ad un aumento nella produzione del TNF- α e/o di interleuchina 1 (IL-1) [13] dai macrofagi con forte espressione delle molecole di adesione intracellulare di tipo I (ICAM-1) [58] delle membrane cellulari degli epatociti e / o delle cellule dell'endotelio sinusoidale. Nei pazienti con NASH, nei quali i danni morfologici e strutturali del tessuto epatico dimostrano particolari similitudini istologiche con quelli tipici del danno epatico etilico, un analogo meccanismo potrebbe indurre un accumulo della concentrazione di ICAM-1.[58]

Nella nostra ricerca, il preciso timing dell'accumulo e secrezione dei neutrofili di MMP-9 è difficile da quantificare. Certamente, comunque, è possibile dimostrare l'immunolocalizzazione di MMP-9 nei neutrofili nei pazienti con NASH rispetto all'immunolocalizzazione di MMP-9 nel citoplasma degli epatociti, dei canalicoli biliari e dei dotti biliari riscontrata nei pazienti con CHC.

Nonostante gli studi dettagliati su specifici substrati, l' esatto ruolo delle differenti metallo proteinasi nel processo di fibrosi epatica e' tuttora sconosciuto. Ma, sebbene le varie forme di epatite cronica [59] abbiano manifestazioni cliniche, anormalita' biochimiche e caratteristiche istologiche non del tutto dissimili, le cause che inducono la produzione e l'accumulo di metallo proteinasi nel processo di fibrosi potrebbero essere differenti a seconda della etiologia, virale o non virale della patologia.

Conclusioni

I nostri risultati derivati dalla comparazione di pazienti con NASH e con CHC potrebbero indicare che nel processo di fibrosi l' espressione delle MMP e' indirizzato in differenti modi, rivolta a differenti targets e probabilmente indotta da differenti meccanismi patogenetici che nel caso della NASH potrebbero essere rappresentati dal richiamo e dall'accumulo di neutrofili. Ciò potrebbe costituire un interessante ipotesi di lavoro volta a individuare agenti in grado di contrastare e/o limitare la fibrogenesi.

Bibliografia

1. Gramlich T, Kleiner DE, McCullough AJ, Matteoni CA, Boparai N, Younossi ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2004;35:196-9
2. Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998;29:836-47.
3. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:S17-29
4. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Ann Epidemiol.* 2007; 17:863-869
5. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)* 2008;115:141-50.
6. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003; 37:917-923.
7. Petrides AS, Stanley T, Matthews DE, Vogt C, Bush AJ, Lambeth H. Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction of hyperinsulinemia normalizes insulin sensitivity. *Hepatology.* 1998; 28:141-149.
8. Shifflet A, Wu GY. Non-alcoholic Steatohepatitis: an overview. *J Formos Med Assoc* 2009;108:4-12.

9. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*. 2005;172(7):899-905.
10. Angulo P: Non-alcoholic fatty liver disease, *NEJM* 2002; vol. 346: 1221-1231.
11. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: the role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000;21:49-98.
12. Bahcecioglu IH, Yalniz M, Atavesen H, Ilhan N, Ozarcan IH, Seckin D, et al. Levels of serum hyaluronic acid, TNF- α and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1549-53.
13. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003;38:413-9.
14. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:345-55.
15. Wei Y, Rector RS, Thyfault PJ, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008; 14(2): 193-199
16. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*. 2002;36(2):403-9.

17. Unger RH, Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J.* 2001;15(2):312-21. Review.
18. Sinha MK, Caro JF. Clinical aspect of leptin. *Vitam Horm.* 1998; 54:1-30.
19. LinksNagao K, Inoue N, Ujino Y, Higa K, Shirouchi B, Wang YM, Yanagita T. Effect of leptin infusion on insulin sensitivity and lipid metabolism in diet-induced lipodystrophy model mice. *Lipids Health Dis.* 2008. 18;7(1):8.
20. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology.* 2006;131(3):934-45. Review
21. Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, et al. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J.* 2007;21(1):53-60.
22. Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, et al. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2005;33(2):151-4.
23. Annuzzi G, Giacco R, Patti L, Bozzetto L, Viscovo D, Rivellese AA. Low plasma leptin levels in well controlled type 2 diabetes are not related to body fat mass and whole-body insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18(7):e35-6.

24. Cho YK, Lee WY, Oh SY, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Kim SW, Oh KW, Yun EJ, Oh ES. Factors affecting the serum levels of adipokines in Korean male patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterologia*.2007;54(77):1512-6.
25. Aller R, de Luis DA, Fernandez L, Calle F, Velayos B, Olcoz JL, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Gonzalez JM. Influence of insulin resistance and adipokines in the grade of steatosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2008;53(4):1088-92.
26. Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg*.2006;16(9):1118-25.
27. Alwayn IP, Verbesev JE, Kim S, et al. A critical role for matrix metalloproteinases in liver regeneration. *J Surg Res* 2008; 145:192-8.
28. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;10:737-44.
29. Geisler S, Lichtinghagen R, Böker KHW, Veh RW. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinase family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res* 1997;289:173-83.

30. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodelling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:728-35.
31. Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-Mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755:37-69.
32. Van del Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37:375-536.
33. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1362-78.
34. Boker KHW, Pehle B, Steinmetz C, Breitenstein K, Bahr M, Lichtinghagen R. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver and serum/plasma in chronic active hepatitis C and HCV induced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2000;47:812-9.
35. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
36. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 2005;41:1313-21.
37. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M et al. Design and validation of histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.

38. Friedman SL. Liver Fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38:S38-53
39. Terada T, Okada Y, Nakanuma Y. Expression of immunoreactive matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human normal livers and primary liver tumours. *Hepatology* 1996;23:1341-4
40. Rasband WS. *Image J*. Bethesda, MD, USA: US National Institutes of Health;1997-2008.
41. Ruifrok AC, Johonston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;29:1-9.
42. Lichtinghagen R, Helmbrecht T, Arndt B, Böker KH. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:65-71.
43. Yanagisawa N, Geironsen L, Al-Soud WA, Ljungh S. Expression of matrix metalloprotease-2, -7 and -9 on human colon, liver and bile duct cell lines by enteric and gastric *Helicobacter* species. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44:197-204.
44. Yoshida C, Kojima H, Lijima T, et al. Association of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) with chronic neutrophilic leukemia. *Eur J Haematol* 2004;72:225-8
45. Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH, Expression of matrix.

46. Núñez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, et al. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 2004;53:1665-72.
47. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, Morel F, Zarski JP, Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid, *Am J Gastroenterol.* 2004 Feb;99(2):271-9.
48. Reif S, Somech R, Brazovski E, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. *Digestion* 2005;71:124-30.
49. Kuo WH, Chou FP, Lu SC, Chu SC, Hsieh YS. Significant differences in serum activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 between HCV- and HBV-infected patients and carriers. *Clin Chim Acta* 2000;294:157-68.
50. Lichtinghagen R, Bahr MJ, Wehmeier M, et al. Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis, *Clin Sci (Lond)*2003;105:373-82.

51. Ljumovic D, Diamantis I, Alegakis AK, Kouroumalis EA. Differential expression of matrix metalloproteinases in viral and non-viral chronic liver diseases. *Clin Chim Acta* 2004;349:203-11.
52. Parks WC, Wilson CL, Lòpez-Boado YS. Matrix Metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:617-29.
53. Elkington PT, O’Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease *Clin Exp Immunol* 2005;142:12-20
54. Saalbach A, Arlnold J, Lessing J, Simon JC, Anderegg U. Human thy-1 induces secretion of matrix metalloproteinase-9 and CXCL8 from human neutrophils. *Eur J Immunol* 2008;38:1392-403.
55. Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Giullamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:1121-6
56. Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol.* 2000 Jun;113(6):443-53.

57. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:202622-7.

1.

58. Shuji Ito, Toyokazu Yukawa, Shinichiro Uetake, and Masayoshi Yamauchi Serum Intercellular Adhesion Molecule-1 in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis: Comparison With Alcoholic Hepatitis [Alcohol Clin Exp Res](#). 2007;31:S83-87.

59. Younossi ZM, Gramlich T Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. Mod Pathol 1998;11:560-5.

60. Geisler S, Lichtinghagen R, Böker KHW, Veh RW. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinase family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. Cell Tissue Res 1997;289:173-83.