

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E PATOLOGIE SISTEMICHE
DOTTORATO DI RICERCA – XXIII CICLO
“Nuovi Sistemi di Valutazione e Studio delle Complicanze
Emodinamiche e Metaboliche delle Epatopatie Croniche”
Coordinatore Prof. Gaetano Bertino

Giuseppe D'Angelo

Ruolo dei radicali liberi nella patogenesi
del danno epatico nella NASH

Tesi di Dottorato di Ricerca

Tutor: Chiar.mo Rosario Scuderi

Relatore: Chiar.mo Prof. Gaetano Bertino

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

INDICE

INTRODUZIONE.....PAG. 3

CAPITOLO 1.....PAG. 8

1. La formazione dei radicali liberi
2. Il meccanismo d'azione dei RL
3. La cellule ed i meccanismi di difesa antiossidanti
4. L'ossidazione: dal danno molecolare a quello d'organo
5. Stress ossidativo nutrizionale

CAPITOLO II.....PAG. 23

1. NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease)
2. Epidemiologia
3. Eziopatogenesi della steatosi

CAPITOLO III.....PAG. 35

1. Evoluzione della steatosi in NASH
2. Diagnosi
3. Terapia
4. NASH e fibrosi epatica

CONTRIBUTO PERSONALE.....PAG. 51

CONCLUSIONI..... PAG. 66

BIBLIOGRAFIA..... PAG. 68

INTRODUZIONE

La pratica clinica segnala un continuo aumento di pazienti asintomatici con ipertransaminasemia in assenza di uso/abuso di alcol; tale aumento appare correlato al costante e progressivo incremento di nuovi casi di disordini del metabolismo, in particolar modo del più complesso quadro clinico della sindrome metabolica, una entità patologica definita dalla coesistenza di diabete, ipertensione, dislipidemia, obesità addominale e sovrappeso. Alla base del disordine metabolico viene segnalato, nella stragrande maggioranza dei casi, uno scorretto stile di vita improntato ad una alimentazione ricca di grassi complicata da una tendenza alla sedentarietà. Il problema del peso corporeo interessa, infatti, un numero sempre maggiore di persone ed in Italia solo il 53% della popolazione può rientrare nella fascia dei “normopeso”; le cose non vanno meglio nel resto del mondo dove si calcola quasi un miliardo di persone con problemi di sovrappeso e obesità. Tali condizioni contraddistinguono individui maggiormente a rischio di sviluppare quelle alterazioni

morfofunzionali del fegato tipiche della steatosi epatica (NAFLD), condizione patologica caratterizzata dall'infarcimento grasso del tessuto epatico che oggi (a differenza del passato dove veniva considerata come entità nosografica benigna spesso di casuale riscontro ecografico) viene temuta per la sua possibile naturale evoluzione in steatoepatite non alcolica (NASH); in tale condizione, alla "semplice" steatosi si associano fenomeni di tipo flogistico-necrotico che ne determinano la possibile evoluzione verso la fibrosi, la cirrosi e l'epatocarcinoma.

Secondo i più recenti studi sull'argomento sono due i momenti patogenetici più rilevanti che caratterizzano i potenziali effetti lesivi epatici, cellulari e tissutali, della sindrome metabolica: lo stress ossidativo e l'insulino-resistenza. Tali condizioni sono ritenute essenziali nel determinismo e nella evoluzione della NAFLD e della NASH.

È bene sottolineare sin d'ora lo stretto nesso temporale tra presenza di NAFLD, evoluzione verso la NASH, cirrosi e sintomatologia clinica.

I pazienti con semplice steatosi epatica hanno prognosi per lo più benigna e un rischio molto basso (nell'ordine dell'1-2%) di sviluppare cirrosi nel corso di 15-20 anni mentre quelli con NASH presentano un rischio di gran lunga maggiore di sviluppare cirrosi ed in tempi molto più ridotti (circa il 22% dei pazienti nell'arco di sette-otto anni sviluppa la severa malattia del fegato).

Il punto fondamentale che segna il passaggio da una condizione essenzialmente benigna come la NAFLD ad una condizione patologica e francamente evolutiva è la Steatoepatite non alcolica (NASH). Questa è una malattia cronica del fegato caratterizzata da una alterazione necro-infiammatoria con infiltrazione grassa degli epatociti che si verifica nei soggetti senza significativo consumo di alcol.

La patogenesi della NASH è ancora poco conosciuta ed i meccanismi sono ancora in fase di indagine attiva. Ad oggi non è chiaro perché alcuni pazienti sviluppino soltanto la steatosi mentre altri pazienti manifestino la progressione dalla "semplice" steatosi alla fibrosi e cirrosi finale.

Come si è avuto modo di osservare, sappiamo come essa sia costantemente associata ad obesità viscerale, dislipidemia, insulino-resistenza e diabete di tipo 2 e potenzialmente correlata ad un aumento del rischio cardiovascolare ma certamente rimangono oscuri non pochi passaggi etiologici e patogenetici.

Diverse linee di studio hanno suggerito che lo stress ossidativo può giocare un ruolo importante nella patogenesi della NASH.

Uno degli obiettivi attuali della ricerca sulla patogenesi della NASH è quello di verificare se i processi biochimici che generano stress ossidativo possono avviare il danno epatocellulare e quindi l'infiammazione. La proposta alternativa è che l'infiammazione potrebbe essere il principale mediatore di danno epatico cellulare e, in questo caso, lo stress ossidativo può essere secondario alla liberazione di mediatori infiammatori, come le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e i nitroradicali. Scopo del presente studio è stato quello di valutare il possibile impegno del sistema ossido-riduttivo e di verificare la presenza di marcatori di flogosi direttamente nel tessuto epatico mediante

l'analisi di campioni biotici prelevati su pazienti affetti da
NASH.

CAPITOLO 1

1. La formazione dei radicali liberi

I RL sono una specie chimica con un numero dispari di elettroni o con uno o più elettroni spaiati. L'energia che dà luogo alla formazione di RL si riscontra nell'irraggiamento, emolisi termica e reazioni di ossido – riduzione. Dei RL alcuni sono instabili e reattivi, altri sono poco reattivi; la reattività dipende da diversi fattori quali la loro concentrazione, la concentrazione di altre sostanze nel mezzo, effetti di risonanza, fattori sterici e dalla temperatura.

La reattività di un RL può essere indicata dalla conoscenza del suo potenziale di ossido – riduzione. Esempi di specie reattive dell'ossigeno o più precisamente dei vari intermedi reattivi in relazione alla riduzione dello stesso sono: • Il RL anione superossido (O_2^-) che è di per sé poco reattivo ma può ossidare, con suoi derivati, molecole organiche; • L'acqua ossigenata (H_2O_2) che si forma a partire da due molecole di superossido per azione dell'enzima superossido – dismutasi. • Il RL ossidrilico

(OH) molto reattivo formato per reazione in cui sono coinvolti metalli di transizione (ferro e rame) e perossidi es. radicale “ferrile” (Fe_2) + acqua ossigenata (H_2O_2) \longrightarrow FeOH_3 + OH. Queste ultime due potrebbero dar luogo nel fegato e precisamente nel sito attivo del citocromo P450 a reazioni di autoossidazione.

- l’ossigeno singoletto, altra specie reattiva
- il monossido di azoto che si forma nell’organismo per via enzimatica.

Biologicamente importanti le reazioni del NO con l’ossigeno con formazione di NO_2 (altro RL) e con l’ossigeno superossido con formazione di perossinitrito (O NO_2) molecola non radicalica.

Questi prodotti di reazione sono molto reattivi. Le specie reattive dell’ossigeno sono indicate con la sigla ROS (Reat Oxygen Species), quelle in cui è presente l’azoto con la sigla RNS (Reactive Nitrogen Species).

2. Il meccanismo d'azione dei RL

Sono previste due modalità:

- a. L'autoossidazione cioè l'ossidazione di materiale organico (lipidi, glucidi, protidi) con ossigeno atmosferico con decomposizione del materiale organico ossidabile e formazione di perossidi, da cui la denominazione dell'autoossidazione anche di "perossidazione".

Di queste la più importante in campo biologico è la lipoperossidazione che riguarda le membrane cellulari, costituite da acidi grassi insaturi e ossigeno molecolare, con loro deterioramento ossidativo e perdita di funzione.

- b. Reazioni radicaliche a catena per le quali si prevede una fase, di formazione dei RL, un'altra di propagazione e un'altra ancora terminale in cui i RL sono distrutti.

Queste reazioni possono essere accelerate dalla luce, dai perossidi e frenate da sostanze dette "inibitori".

Gli inibitori possono riguardare i processi di autossidazione e vengono detti antiossidanti, come antiossidanti sono anche denominate le sostanze che impediscono le reazioni radicaliche a catena, tra questi gli antiossidanti primari che agiscono sulla fase di “iniziazione” della catena (sostanze chelanti i metalli di transizione, composti che proteggono la sostanza organica dall’alterazione fotochimica assorbendone le radiazioni). Nell’organismo ad avere una funzione antiossidante primaria sono le catalasi e la glutazione - perossidasi. Vi sono poi gli antiossidanti secondari che interferiscono per lo più con i radicali propagatesi dalla catena, detti anche “chain breaking”. Nelle cellule un importante antiossidante di questa categoria è la vit E presente nella componente lipidica delle membrane.

Per quanto riguarda il meccanismo d’azione dei RL i vari studi chimici, biochimici ed in vitro hanno rilevato che le elevate condizioni ossidanti sono lesive per le cellule, condizione cioè che vedono i RL come mediatori del danno tissutale, ma a basse concentrazioni gli stessi RL possono produrre effetti benefici comportandosi da intermedi metabolici o secondi messaggeri,

intervenendo nelle risposte cellulari ad agenti dannosi (infettivi), nell'induzione di una risposta genica, e per le quali è importante il "balance – redox" intracellulare. I ROS regolano l'espressione (inibendola) dei prodotti dei geni responsabili della flogosi vascolare come VCAM – 1 (vascular cell adhesion molecole – 1) e MCP – 1 (monocyte chemoattractant protein -1) in risposta a stimoli proinfiammatori. L'NO è prodotto dalle cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, fibroblasti; quello endoteliale ha effetto antiaterogenico perché inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione piastrinica, modula il tono vasomotorio, modula (sopprimendola) l'espressione di taluni geni "infiammatori" (VCAM -1 e MCP - 1), inibisce il danno tissutale mediato dai ROS, l'ossidazione delle LDL, ritarda la formazione di lipoperossidi. Può però anche reagire con l'anione superossido producendo anione perossinitrito (ONOO) che è un potente ossidante per cui l'NO è un prototipo di RL che svolge una doppia funzione redox.

I RL con effetti biologicamente rilevanti sono il superossido (O_2^-), il radicale ossidrile ($\cdot OH$) e il monossido di azoto (NO). I RL

possono formarsi allorchè le cellule sono esposte a radiazioni ionizzanti o eccitanti in relazione alla radiolisi dell'acqua cellulare con produzione di $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , H_3O^+ , $\text{HO}_2\cdot$; questa costituisce una sorgente primaria di radicali liberi.

La formazione di RL a seguito delle attivazioni metaboliche di alcuni farmaci (come il CCL_4) con l'intervento del citocromo P450, rappresenta una sorgente secondaria di RL. Il danno tissutale provocato dai RL dell'ossigeno è dovuto a processi di lipoperossidazione delle membrane cellulari o autoossidazione dei loro lipidi insaturi; l'alterazione delle membrane dà luogo alla perdita della loro permeabilità ionica selettiva e della loro attività enzimatica. I RL dell'ossigeno e dell'azoto sono poi anche responsabili di alterazioni del DNA e costituiscono importanti mediatori della flogosi e della trasformazione maligna.

La presenza di RL può avere riflessi sulla risposta infiammatoria iniziandola e amplificandola. Infatti la loro interazione con i lipidi insaturi può dar luogo a fattori chemiotattici per i fagociti; inoltre possono aumentare l'attività delle proteasi lisosomiali dei leucociti attivati cui consegue un aumento del danno tissutale;

possono alterare la matrice extracellulare (es. depolimerizzazione dell'acido ialuronico). La protezione dei tessuti si può avere con un trattamento enzimatico combinato di superossido – dismutasi e catalasi.

Il primo enzima favorisce la trasformazione di O_2 in H_2O_2 con rimozione di O_2 dall'ambiente di reazione per cui diminuisce l'interazione di O_2 con lipidi specifici e quindi la formazione di fattori chemiotattici con minor afflusso di fagociti nel focolaio di lesione. La catalasi favorisce la trasformazione di H_2O_2 e O_2 con minor presenza di H_2O_2 che è il substrato dell'enzima leucocitario mieloperossidasi e inibisce la produzione di OH. Ancora nelle ossidazioni biologiche così come in certi casi di flogosi sperimentale è stata dimostrata l'importanza del ruolo svolto dagli ioni ferro e il trattamento che li chela ha mostrato un'efficacia superiore a quello combinato di superossido – dismutasi con catalasi.

La presenza notevole di ferro fa scattare un meccanismo omeostatico di difesa, con l'aumento della ferritina, proteina in cui il Fe_3^+ può depositarsi finchè alla sua saturazione la presenza

nella cellula di ferro “libero”, redox attivo darà luogo attraverso la produzione di OH ad una serie di ossidazioni. Negli organi sensibili al sovraccarico di ferro (cuore, cervello, cellule β pancreatiche) le lesioni cellulari sono anche in relazione ad una elevata respirazione mitocondriale che provoca una aumentata produzione di specie reattive dell’ossigeno che interagendo con gli ioni ferro danno luogo al danno cellulare.

I RL dell’ossigeno possono anche essere responsabili della trasformazione neoplastica delle cellule condividendo con le sostanze cancerogene alcuni tipi di attività biologica rendendosi responsabili delle alterazioni permanenti del DNA, modulando l’attività dei geni dello stress cellulare che regolano i geni effettori della crescita, del differenziamento e della morte cellulare.

3. La cellula ed i meccanismi di difesa antiossidanti

La cellula vivente per proteggere le proprie strutture dai RL reattivi generati dal metabolismo ha elaborato nel tempo dei

meccanismi di difesa antiossidanti, appunto, costituiti da molecole (ascorbato, tocoferoli) ed enzimi (GSH – perossidasi, catalasi, superossido dismutasi). I primi sono anche implicati a livello plasmatico nel controllo dei complessi reattivi di rame e ferro. I secondi non sono presenti nel liquido extracellulare.

L' α – tocoferolo è per lo più presente nelle membrane cellulari data la sua natura lipofila e reagisce maggiormente con i RL perossilici derivanti dall'autoossidazione dei lipidi insaturi.

L'ascorbato, idrosolubile, è presente nel citosol e nel liquido extracellulare e interagendo con i RL da luogo ad un RL intermedio, l'ascorbile, che può essere ridotto dall'NADH reduttasi con riformazione di ascorbato.

Gli anioni superossido vengono ridotti dall'enzima superossido dismutasi che dismuta l'ossigeno superossido ad acqua ossigenata. Sia le superossido dismutasi che l' α – tocoferolo se da un lato rimuovono i radicali liberi da un altro fanno aumentare nella cellula i livelli H_2O_2 , come detto, e di idroperossidi lipidici potenzialmente tossici perché in presenza di ferro danno luogo a $\cdot OH$ molto reattivi. Nel metabolismo dell'acqua ossigenata

interviene quindi l'enzima catalasi, eme –enzima concentrato per lo più nei perossisomi e nei mitocondri, che opera una riduzione e decompone l' H_2O_2 a H_2O .

Nel metabolismo degli idroperossidi interviene un selenio –enzima, la GSH – perossidasi, contenuta nel citosol e nei mitocondri, che riduce gli idroperossidi lipidici ai più stabili derivati alcolici, con l'ossidazione di GSH (glutazione ridotto) a GSSG (forma ossidata di glutazione). Vi sono poi gli enzimi di riparazione del danno ossidativo al DNA che preservano il materiale genetico dall'ossidazione. Si è anche constatato che quando nella cellula, a seguito di modificazioni ambientali aumentano le condizioni ossidanti, dapprima si verifica l'intervento dei meccanismi di difesa sopracitati cui fa seguito l'attivazione di alcuni geni che codificano per proteine ad azione antiossidante. In vitro si è visto che le cellule in condizione di stress ossidativo producono di più una proteina, l'enzima eme –ossigenasi, che è un indicatore efficace ed importante meccanismo nella difesa cellulare del danno ossidativo.

4. L'ossidazione: dal danno molecolare a quello d'organo

La cellula in ogni suo distretto presenta molecole redox sensibili che rivestono un importante ruolo nella regolazione di molti processi metabolici. Lo stato ossido riduttivo della cellula dipende dal rapporto 2 GSH / GSSG mentre la reazione redox più probabile è lo scambio tiolo ↔ disolfuro.

Agenti ossidanti esogeni (raggi x – uv) alterando i livelli di GSH e favorendo la formazione di disolfuri misti favoriscono la formazione nella cellula di specie reattive dell'ossigeno con blocco del ciclo cellulare e apoptosi. A sua volta la presenza di specie reattive dell'ossigeno a livello citoplasmatico può dar luogo all'attivazione dei fattori di trascrizione come ad esempio:

- a) Il fattore nucleare KB (NF – KB) che attiva geni che codificano per citochine infiammatorie (IL – 6, TNF – β).
- b) La proteina attivante – 1 (AP – 1) che attiva il gene che codifica per la più importante citochina fibrogenetica TGF – β , che è all'origine poi della patogenesi della NASH cioè del passaggio dalla semplice steatosi alla comparsa della flogosi, necrosi ed evoluzione fibrotica della malattia.

Importante quindi lo studio dello stress ossidativo e dei meccanismi di difesa antiossidanti dal momento che è patogeneticamente rilevante il ruolo del danno ossidativo da RL nella patologia caratterizzata da progressiva fibrosi (colestasi cronica, fibrosi e cirrosi epatica, emocromatosi, m. di Wilson, intossicazione alcolica cronica), morbo di Parkinson, aterosclerosi, morbo di Alzheimer, invecchiamento, diabete mellito.

5. Stress ossidativo nutrizionale

L'apporto alimentare comporta modificazioni importanti dello stato ossido – riduttivo dell'organismo. L'argomento è da tener in grande considerazione dal momento che nella popolazione occidentale gran parte del giorno è interessato dallo stato post prandiale.

È stato dimostrato che l'iperglicemia è responsabile di uno stress ossidativo intracellulare con alterazioni della funzione vascolare.

Infatti l'iperglicemia promuove la formazione di superossido e la lipoperossidazione.

Aumenta inoltre l'espressione di VCAM – 1 responsabile del danno vascolare; ciò può essere bloccato dagli antiossidanti.

L'ipertrigliceridemia è a sua volta responsabile dell'attivazione di talune cellule, monociti e cellule polimorfonucleate, con produzione di ROS.

Ciò comporta ridotta biodisponibilità di NO, ossidazione delle LDL in circolo, mentre nei diabetici aumenta la produzione di AGE_s. Lo stress ossidativo dietetico pertanto assieme ad una ridotta disponibilità di sostanze antiossidanti (Vit. E, C, polifenoli, carotenoidi, selenio) è responsabile di un aumentato rischio di obesità, aterosclerosi, diabete. Sperimentalmente, però, è stato dimostrato da un lato che l'ossidazione delle LDL native, biologicamente inattive, conferiva alle stesse proprietà aterogene (effetto proliferativo sulle cellule muscolari lisce, adesione dei monociti all'endotelio) mentre dall'altro è stato dimostrato l'effetto opposto. Infatti le LDL ossidate avrebbero in tal senso un effetto antiaterogeno attraverso l'inibizione del PDGF, cioè

del fattore che stimola la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Conseguentemente il rapporto causa – effetto tra LDL ossidate e aterogenesi è ancora nebuloso.

È comunque sempre più evidente la correlazione tra fenomeni postprandiali e aterogenesi così eventi biologici proaterogenici hanno mostrato le LDL minus, derivate dall'incorporazione degli idroperossidi lipidici alimentari che sfuggendo alla barriera gastrointestinale vengono poi incorporate alle lipoproteine plasmatiche. Le LDL minus hanno un loro ruolo nell'aterogenesi perché provocano la produzione di citochine proinfiammatorie e la citotossicità nelle cellule vascolari. Importante quindi la riduzione di questi idroperossidi lipidici a livello gastroenterico da parte del sistema enzimatico in particolare la glutatione per ossidasi (GPX) selenio dipendente, enzima la cui biosintesi dipende dalla presenza di selenio (cofattore dell'enzima).

L'apporto di selenio con l'alimentazione pertanto previene l'aumento delle LDL minus postprandiale diminuendo il disturbo dello stato ossido – riduttivo in questa fase, in modo particolare in pazienti iperglicimici e con iperlipidemia e agisce sulla

regolazione del tono vasale interferendo in special modo nella fase di vasodilatazione; si capisce pertanto l'importanza della assunzione con la dieta di sostanze antiossidanti come vitamine e polifenoli ai fini anche di un netto miglioramento della disfunzione endoteliale.

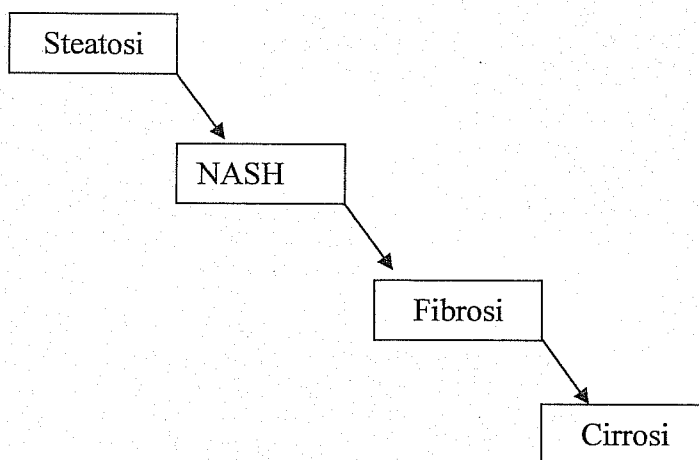
CAPITOLO II

1. NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease)

Le NAFLD sono un gruppo di patologie per le quali si è constatato un trend di progressivo aumento, quindi in netta espansione dal punto di vista epidemiologico.

Comune denominatore è il riscontro di grasso degli epatociti con un quadro istologico sovrapponibile alle forme alcol-correlate in assenza di uso/abuso di alcol, mentre dal punto di vista clinico i pazienti sono asintomatici o paucisintomatici con una alterazione cronica delle transaminasi con negatività di altre cause di danno epatico (eziologia virale, autoimmune, colestatica, tossica, alcolica, metabolico – ereditaria). Nell'ambito della storia naturale di queste patologie il punto di partenza è costituito dalla steatosi cioè dal semplice accumulo di lipidi; trattasi del fegato grasso per il quale è corretto affermare che esso tende a presentare un decorso sostanzialmente benigno. Il danno tuttavia può progredire verso la forma in cui alla steatosi si associa una attività necro - infiammatoria configurandosi così la steatoepatite

o NASH (Non Alcoholic Steato Hepatitis), quadro ancora reversibile, fino alla fibrosi epatica con evoluzione in cirrosi (irreversibile) e l'epatocarcinoma (tasso incidenza: 0,4 -1,7 per 1000 per anno).



2. Epidemiologia

Si è constatato che la NAFLD è la principale causa di ipertransaminasemia cronica e nell'ambito di questa patologia la biopsia epatica ha evidenziato segni di steatosi epatica nel 15 – 39% dei pazienti e di steatoepatite nell'1-5%. Riguardo la Steatosi epatica non alcolica, o fegato grasso, i numeri sono

allarmanti: colpisce il 30% degli adulti italiani, il 20% dei bambini e adolescenti, l'80% dei diabetici. Percentuale che arriva al 50% tra le persone obese.

Questa patologia del fegato riguarda il 10-15% della popolazione generale (interessa in media 1 italiano su 5) con percentuali di gran lunga superiori (fino a valori di 50-90%) nei pazienti obesi.

I dati epidemiologici indicano l'importanza del problema tenuto conto che la percentuale degli obesi nel nostro Paese è significativa (18%) e in particolar modo perché si osserva, oramai da anni, un trend di progressivo aumento di queste persone (che tra gli anni '90 ed i primi del 2000 sale dal 10 al 18%) nonché anche di quelle in sovrappeso.

Il problema del peso corporeo, infatti, interessa un numero sempre maggiore di persone; in Italia solo il 53% della popolazione può rientrare nella fascia di "normopeso", mentre nel resto del mondo si calcola quasi un miliardo di individui con problemi di sovrappeso e obesità.

3. Eziopatogenesi della steatosi

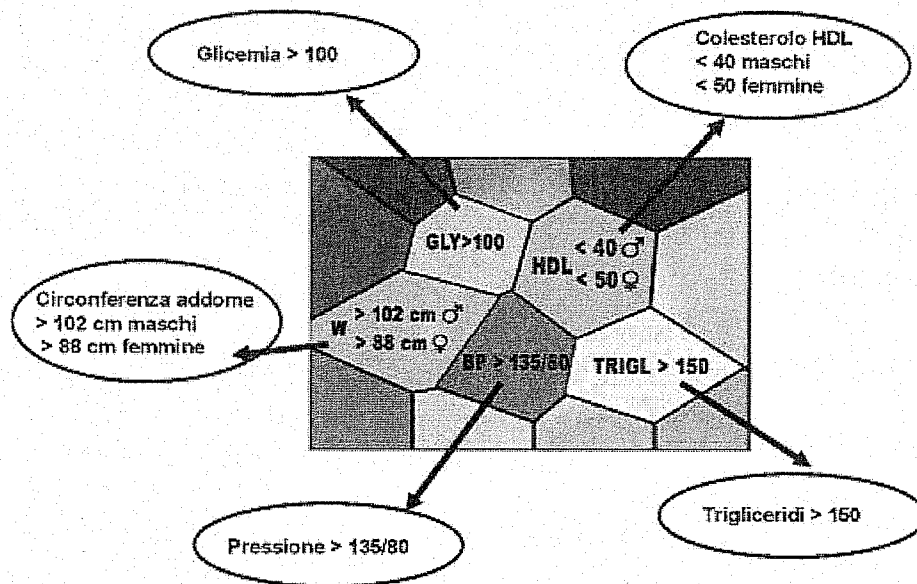
L'accumulo di lipidi nelle cellule epatiche costituito per lo più da acidi grassi e da grassi neutri (trigliceridi) ma anche da piccole quantità di colesterolo, esteri dello stesso, e fosfolipidi può essere in relazione a diverse condizioni che vanno dall'assunzione di farmaci (corticosteroidi, tamoxifene, amiodarone, diltiazem, inibitori delle proteasi, alcuni antibiotici es. tetracicline), disordini metabolici congeniti (lipodistrofia, $\alpha\beta$ lipoproteinemia, sindr. Weber - Christian, glicogenosi, galattosemia) e acquisiti (obesità, sindrome metabolica, diabete mellito, dislipidemia), gravidanza, alterazioni di tipo nutrizionale (malnutrizione proteica - calorica, nutrizione parenterale totale, chirurgia gastrointestinale per l'obesità).

Nelle diverse patologie responsabili si verifica una alterazione del metabolismo lipidico con diminuzione della lipolisi e aumento della lipogenesi; dal punto di vista biochimico infatti si verifica una aumentata presenza di acidi grassi in relazione ad un loro ridotto smaltimento per deficit della β - ossidazione o per ridotta emissione degli acidi grassi dall'epatocita per ridotta

sintesi di lipoproteine; a ciò consegue l'aumento di trigliceridi nella cellula epatica, quindi la steatosi cioè la prima del gruppo di patologie che costituiscono le NAFLD.

È già stato provato che all'origine dello sviluppo della steatosi e soprattutto della steatoepatite c'è l'insulino – resistenza e un'alterazione correlata con lo stress ossidativo che risultano alla base del danno epatociti. Tali condizioni sottendono spesso una sindrome metabolica cioè quel complesso e articolato disordine del metabolismo che comporta altresì la presenza di altri fattori di rischio cardiovascolare come obesità viscerale, dislipidemia aterogena, intolleranza agli idrati di carbonio, ipertensione arteriosa. I sopracitati criteri della sindrome metabolica sono quindi considerati fattori predisponenti allo sviluppo della steatosi oltre al consumo di alcol e all'infezione da HCV (in particolare il genotipo 3). La diagnosi di sindrome metabolica può essere formulata in presenza delle seguenti caratteristiche: glicemia > 100 mg/dl; colesterolo HDL < 40 mg/dl nei maschi e < 50 mg/dl nelle femmine; circonferenza addome > 102 cm nei

maschi e > 88 cm nelle donne; PA 135/80 mmHg; trigliceridi > 150 mg/dl.



La sindrome metabolica viene definita tale quando vi è la presenza di almeno due elementi di quell'insieme di fattori di rischio che la determinano (es. glicemia > 100 mg/dl con obesità con diametro addominale > 88 cm in una donna o colesterolo HDL basso < 40 in un maschio con trigliceridi > 150 mg/dl). Si è visto che malgrado le NAFLD sono patologie ad eziologia multifattoriale esse sono causate prevalentemente dalla sindrome

metabolica. L'insulino resistenza, condizione in parte geneticamente determinata, è l'alterazione metabolica per cui quantità fisiologiche (normalmente presenti) di insulina producono una risposta biologica ridotta cui consegue un aumento dei valori di insulina. È stato anche visto che nello sviluppo di questo disturbo metabolico è importante il ruolo svolto da una citochina pro-infiammatoria (il TNF- α) la cui secrezione è aumentata.

È oramai chiaro che la patogenesi della steatosi è in relazione a diversi fattori ma è l'insulino-resistenza con la conseguente iperinsulinemia a giocare un ruolo significativo. Infatti essa determina la lipolisi del tessuto adiposo da cui scaturiscono gli FFA che si accumulano nel fegato ed il blocco della β -ossidazione mitocondriale con accumulo di trigliceridi nelle cellule epatiche; quest'ultima secondaria anche alle diminuita secrezione di un'altra citochina, l'adiponectina. Ed ancora risulta essere propria l'iperinsulinemia la causa della sintesi lipidica a livello giusto del fegato proprio grazie all'aumento di talune proteine che in tal senso agirebbero. Ad incrementare inoltre

l'accumulo di trigliceridi a livello epatico concorre la diminuita sintesi in tale sede delle VLDL che hanno la funzione di veicolare questi grassi fuori dall'organo.

L'insulino resistenza può essere quantitativamente valutata con l'indice di HOMA (ottenuto moltiplicando la insulinemia a digiuno in $\mu\text{UI/ml}$ per la glicemia a digiuno in mmol/L e dividendo tutto per 22.5).

Vi è poi da considerare lo stress ossidativo, altra condizione cui sottende spesso la sindrome metabolica, che assieme alla steatosi costituisce la patogenesi della NASH istologicamente caratterizzata da disordini necroinfiammatori e presenza di trigliceridi negli epatociti. Lo stress ossidativo, che fa parte del II "step" nell'ambito dell'ipotesi patogenetica a due "step" della NASH, è responsabile della lipoperossidazione della membrana epatocitaria, della attivazione delle cellule stellate di Ito e l'induzione di citochine proinfiammatorie. Nei pazienti con NASH è già stato evidenziato un serio danno che riguarda il metabolismo del glutatione, con alterazione del rapporto GSSG /GSH e dell'attività degli enzimi antiossidanti nel siero.

In questa fase un ruolo importante è svolto dai ROS generati da una aumentata ossidazione degli acidi grassi. La fonte cellulare più importante dei ROS è data dai mitocondri e la loro disfunzione può avere notevoli riflessi sulla fisiopatologia della NASH. Il danno della membrana mitocondriale comporta ridotta produzione di ATP con apertura di megacanaloni da cui escono nel citosol proteine che possono dar luogo ad apoptosi; se poi la disfunzione riguarda molti mitocondri si verifica una caduta in verticale della produzione di ATP con morte delle cellule per via non apoptotica. Vi è poi l'altra proposta fatta circa la fisiopatologia della NASH secondo cui la flogosi potrebbe essere il mediatore primario del danno epatocitario e in tal caso lo stress ossidativo sarebbe secondario al rilascio di mediatori flogistici come i nitroradicali e le specie reattive dell'ossigeno.

Tra i radicali maggiormente responsabili del danno cellulare vi è il radicale superossido prodotto dalla xantina-ossidasi (XO) che catalizza l'ultima reazione del metabolismo purinico. Una aumentata attività di questo enzima ha pertanto un effetto

generante questo radicale. L'anione superossido viene poi convertito dagli enzimi antiossidanti SOD (con dismutazione in H_2O_2) e GPx (conversione da H_2O_2 a H_2O); tra gli agenti antiossidanti anche i gruppi tiolici che agiscono da "free radical scavengers". Si è anche visto che pazienti con NASH presentano maggior rischio di sviluppare malattie cardiovascolari; è già stato accertato il ruolo nella patogenesi della patologia aterosclerotica dell'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) nella parete arteriosa così come è stato dimostrato il ruolo protettivo di tale ossidazione da parte dell'enzima paraoxonasi (PON 1), legato alle HDL, che si comporta da antiossidante.

Un ruolo importante riveste anche l'NO sintetizzato dall'endotelio e ad azione vasodilatante. Nei pazienti con NASH è stato riscontrato un basso livello sierico di NO e ridotta attività degli enzimi SOD e GPx nonché un'augmentata attività della XO che porta alla produzione del radicale superossido. La reazione di NO con il radicale superossido dà luogo ad un potente ossidante, il perossinitrito con aumento dello stress ossidativo. Il basso livello sierico di NO in questa patologia può essere in relazione

in prima battuta all'incremento di RL con danno alle cellule endoteliali e la successiva reazione tra NO e R superossido completa l'opera.

Lo stress ossidativo sopracitato produce, per come detto, ROS e aumento della lipoperossidazione con danno della membrana cellulare e morte della cellula. Importante il ruolo di talune citochine, prodotte dai leucociti attivati, che aumentano l'attività della xantino ossidasi endoteliale con rilascio di ROS a questo livello e conseguente alterazione del tono vasale. Si evince così che nella NASH lo stress ossidativo assume un ruolo patogenetico importante e per antagonizzare il quale è utile porre in atto idonea terapia antiossidante. Quindi la NASH è da considerare come una malattia metabolica multifattoriale che vede due momenti patogenetici fondamentali e cioè l'insulino resistenza e lo stress ossidativo, elementi entrambi che, come detto, sottendono spesso una sindrome metabolica caratterizzata da adiposità splancnica che è un importante sorgente di trigliceridi con steatosi, obesità, ipertensione, basso colesterolo HDL e ipertrigliceridemia.

Inoltre sono state osservate nella NASH lesioni nella struttura dei mitocondri causate dagli acidi grassi non esterificati che disaccoppiano la fosforilazione ossidativa con aumentato consumo di ossigeno e produzione di ROS che, a loro volta, mediano il rilascio di TNF - α dalle cellule di Kupffer e innescano la lipoperossidazione per la diminuzione di agenti antiossidanti.

CAPITOLO III

1. Evoluzione della steatosi in NASH

La steatosi, rispetto ad un fegato normale, rende l'organo più vulnerabile allorché questo viene esposto ad ulteriori fattori di danno (farmaci, alterazioni della flora batterica intestinale).

L'innescò della componente necroinfiammatoria di un fegato grasso e la successiva fibrosi è legato all'alterazione del balance ossido reductivo (stress ossidativo) e alla produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) per cui i pazienti con NASH trovano giovamento dalla presenza di antiossidanti nella dieta.

Si è visto che la steatosi è una condizione predisponente verso la NASH. Nel fegato steatosico infatti i trigliceridi presenti nelle cellule epatiche attivano le lipossigenasi mitocondriali con produzione RL responsabili di una serie di eventi successivi che vanno dalla lipoperossidazione alla produzione di citochine (TNF – α , TGF – β , IL – 8) che danno luogo a necrosi epatocitaria, sintesi di collagene e chemiotassi neutrofila.

Vi sono inoltre studi in corso riguardanti la relazione tra il ferro presente nel fegato, dimostrato in pazienti con NAFLD, e lo stress ossidativo con conseguenziale danno epatico; a favorire l'accumulo di ferro nella cellula epatica è l'insulino resistenza con iperinsulinemia responsabile nell'epatocita dell'espressione del recettore per la transferrina.

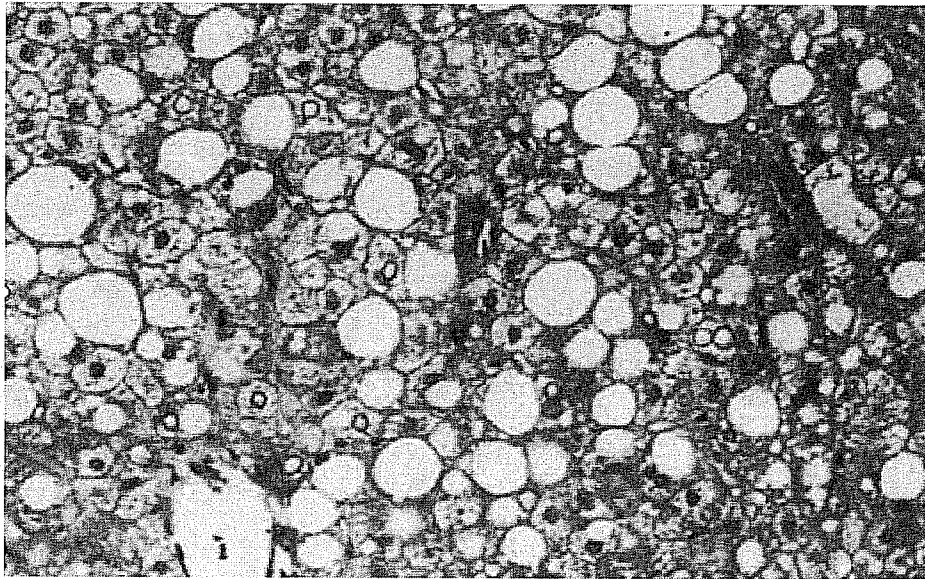
L'accumulo di ferro secondo alcuni può dar luogo ad un aumento della attività necroinfiammatoria e ad una fibrosi più intensa mentre secondo altri l'aumento della componente fibrotica è in relazione all'età del paziente (ipotesi suffragata dal fatto che pazienti con NASH sono più avanti in età rispetto a quelli con semplice steatosi).

L'aumento poi della ferritinemia è con molte probabilità in relazione solamente all'attività flogistica.

Date le ipotesi fatte si discute oggi se non è il caso, in corso di NASH, trattare l'accumulo di ferro.

2. Diagnosi

La biopsia epatica rappresenta il gold standard diagnostico della condizione clinica NASH essendo la diagnosi di NASH una diagnosi istologica.



Quadro istologico della NASH

Questa patologia riguarda per lo più pazienti oligosintomatici, a volte ipertesi, in sovrappeso con aumento di adiposità centrale, riscontro bioumorale di aumento delle transaminasi AST, ALT (2-5 volte), di FA e γ GT.

Vi sono inoltre bassi livelli di colesterolo HDL, ipertrigliceridemia e iperuricemia. I pazienti, spesso con familiarità per diabete mellito, hanno iperinsulinemia a digiuno; negativi i markers virali (HBV e HCV), nella norma la ceruloplasmina e l' α - 1 antitripsina. In tali pazienti vi è astensione da bevande alcoliche. All'esame obiettivo si riscontra spesso epatomegalia.

La diagnosi di steatosi è anche affidata a metodiche di imaging (ecografia, TC, RMN); tra queste la più diffusa è l'ecografia anche se non molto sensibile dal momento che non viene rilevata se la steatosi è < 30% di compromissione degli epatociti.

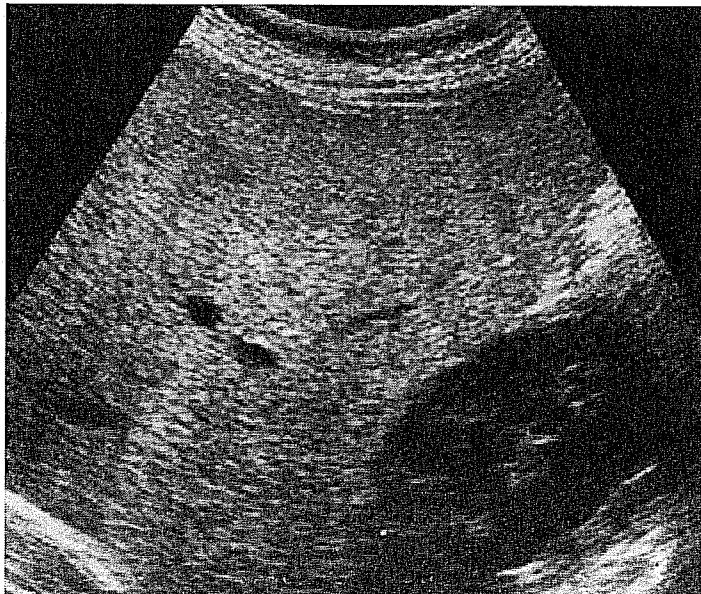


Immagine ecografica di steatosi epatica

L'ecocolordoppler mette in rilievo una ecostruttura epatica iperecogena a margini arrotondati mentre nei limiti appaiono la milza e l'asse spleno-portale. Ai fini di una quantificazione, sia pure approssimativa, della steatosi è utile considerare oltre che la ecostruttura epatica (iperecogenicità diffuse, settoriali, attenuazione posteriore) anche il calibro e il decorso delle vene sovraepatiche e la loro morfologia all'esame ecodoppler (es. il caso di steatosi di grado marcato sono presenti attenuazione sonora posteriore e al doppler assenza della normale morfologia trifasica).

Per quanto concerne la fibrosi l'iperecogenicità non è un reperto abbastanza sensibile e specifico. Nei pazienti con NASH la biopsia epatica dimostra una steatosi macrovescicolare, una flogosi con presenza di neutrofilo e cellule mononucleate in sede lobulare, la fibrosi (perisinusoidale) si riscontra in una elevata percentuale di casi (84%) mentre la distorsione dell'architettura epatica tipica della cirrosi è presente nel 7-16% dei casi.

Ai fini della progressione e quindi nella valutazione della reversibilità del processo fibrotico è importante considerare la

neoangiogenesi, perché la reversibilità della fibrosi è inversamente proporzionale alla neoangiogenesi.

Questa ultima inizia allorché la fibrosi inizia ad estendersi verso la vena centrolobulare.

Importante a tal uopo il concetto per cui ogni epatopatia ha un suo modo di “fare fibrosi”; nella NASH, come detto, la fibrosi è perisinusoidale “Chicken Wire” e interessa il lobulo epatico nella zona 3 quindi vicino alla vena centrolobulare, mentre la fibrosi relativa a infezioni virali o processi flogistici delle vie biliari riguarda gli spazi portali. La classificazione della fibrosi con il sistema METAVIR prevede 5 stadi che vanno dalla sua assenza alla fibrosi portale senza setti, a quella con pochi setti, a quella settale senza cirrosi, alla cirrosi; si è visto che lo score è operatore dipendente nei valori intermedi, non così quando lo score da assegnare è F0=fibrosi assente o F4=cirrosi. Ai fini della diagnosi di steatosi epatica non si rende necessaria la biopsia epatica ed i pazienti vengono opportunamente rassicurati circa la benignità di tale condizione clinica e sollecitati a seguire un

programma terapeutico che prevede la correzione delle alterazioni metaboliche eventualmente presenti.

In presenza di statosi epatica, soprattutto in pazienti con età > 45 anni, diabetici e obesi bisognerebbe sempre sospettare una steatoepatite non alcolica; la biopsia epatica rappresenta il gold standard diagnostico per tale condizione clinica che va considerata come una epatopatia cronica potenzialmente evolutiva e pertanto meritevole di attento follow-up e di adeguata terapia. Da rilevare infine che alcuni pazienti non diabetici ne obesi ma con alterazione degli enzimi epatici in assenza di cause note di epatopatia possono presentare tale condizione clinica (NASH): costante in questi casi uno stato di insulino – resistenza. Un percorso diagnostico accreditato in caso di sospetta epatopatia di tipo steatosico prevede:

- Esami di 1° livello: - riscontro bioumorale di persistente alterazione di AST e ALT in pazienti con negatività per markers virali (HBV, HCV), astemi o con minima assunzione di alcool.

- EO: lieve epatosplenomegalia con eventuale presenza di segni cutanei; reperti cioè di riscontro nel danno epatico cronico.
- Calcolo delle BMI, misurazione della PA e della circonferenza addominale.
- Esami di 2° livello: glicemia, colesterolo, trigliceridi, LDL, FA, γ GT, ANA, AMA, SMA, bilir. frazionata, emocromo, sideremia, saturazione transferrina, ferritinemia, anticorpi anti-endomisio, ecografia epatica.
- Esami di 3° livello: - Ceruloplasmina, α -1antitripsina, cupremia, mutazione HFE, OGTT con determinazione di insulinemia basale e a 120 minuti.
- Biopsia epatica: in pazienti con esami biochimici persistentemente alterati nonostante dieta ipolipidica (o ipocalorica se in sovrappeso) per 4 mesi.

3. Terapia

Si premette il concetto secondo cui il 10-15% dei casi di cirrosi e di insufficienza epatica non ha alcun fattore eziologico definito, ma potrebbe essere legato all'insieme di anomalie metaboliche che definiamo sindrome metabolica che, come detto, è la componente della coesistenza di diabete, ipertensione, dislipidemia, obesità addominale e che scaturisce da uno scorretto stile di vita eminentemente improntato ad una alimentazione ricca di grassi cui fa riscontro la sedentarietà. In queste circostanze un intervento precoce potrebbe evitare danni epatici pericolosi. Quindi vanno osservate alcune regole alimentari così da prevenire, per quanto possibile, il sovrappeso attraverso una dieta adeguata (meglio quella mediterranea) affiancata all'attività fisica. È importante che il paziente da un lato aumenti l'attività aerobica e dall'altro riduca in maniera graduale la quantità di calorie d'assumere. Ciò comporta una riduzione dei livelli di transaminasi, farà migliorare la sensibilità all'insulina per aumento del numero dei recettori cellulari a

livello muscolare periferico e riduce la concentrazione postprandiale di trigliceridi.

Ne consegue il miglioramento del profilo cardiovascolare e decresce il grado di stasi epatica. Importante il concetto secondo cui occorre raggiungere l'obiettivo cioè la perdita di peso con gradualità evitando una dieta troppo severa o il digiuno. Sono questi gli errori che possono comportare un aumento dell'attività necroinfiammatoria favorendo la progressione della malattia.

Ciò in relazione ad un aumento della lipolisi e rilascio di acidi grassi non esterificati, deplezione di glutazione e conseguenziale rischio di attività lipoperossidative e rilascio di citochine (TNF - α). Quindi dieta e attività fisica costituiscono i cardini terapeutici di questa patologia, mentre in presenza di diabete e dislipidemia vengono spesso avviate terapie anche farmacologiche; per la cura del diabete un vantaggio deriva dall'uso di talune molecole quali la metformina come anche i tiazolidinedioni (rosiglitazone e pioglitazone) e per le dislipidemie l'uso dei fibrati. Utili anche l'utilizzo di antiossidanti con l'alimentazione (quali vitamina E,

C, la N-acetilcisteina, la betaina, β carotene, selenio, zinco) che minimizzando lo stress ossidativo contrastano i meccanismi patogenetici che portano alla NASH.

4. NASH e fibrosi epatica

Consideriamo le caratteristiche istologiche di steatoepatite non alcolica (NASH) (in stadiazione). Oltre alla classificazione dell'attività necroinfiammatoria della NASH, l'altra componente principale della sua valutazione istologica verte sulla distorsione architetturale misurata dal pattern di fibrosi ed indicata come "stadio". Il pattern di stadio 1° di fibrosi è inizialmente osservato negli spazi perisinusoidali perivenulari della zona 3, di solito in associazione con altre lesioni di steatoepatite. Il pattern di stadio 2 di fibrosi è caratterizzato da una estesa fibrosi "reticolare". Questo pattern distingue l'epatopatia alcolica e da NASH da altre forme di epatopatia cronica in cui la fibrosi è inizialmente portale. La fibrosi epatica si caratterizza per l'aumentata deposizione nello spazio extracellulare di tessuto connettivo che

comprende collagene (in particolare di tipo I e di tipo III), glicoproteine (laminina) e proteoglicani.

Nei soggetti con fibrosi è stato osservato un aumento della attività collagenasica (inibitore tissutale della metalloproteinasi).

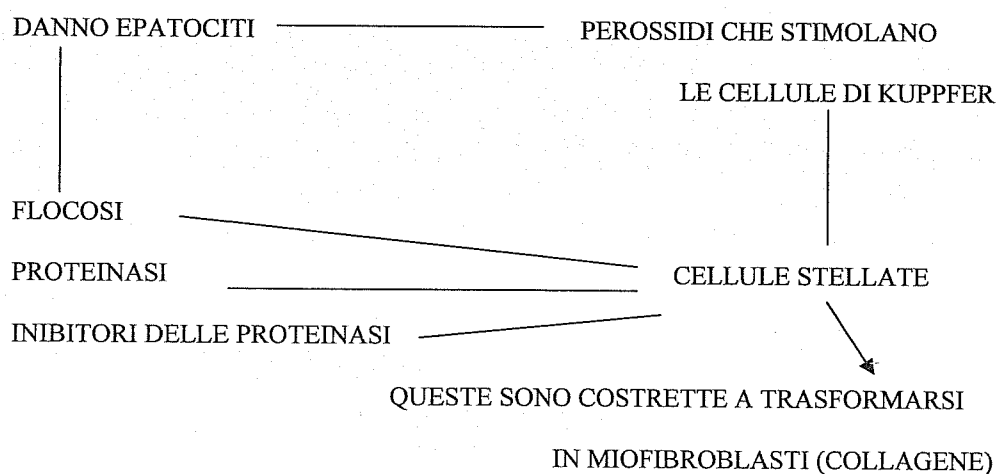
Il punto iniziale del processo è nelle cellule endoteliali che secernono fibronectina che altera la matrice extracellulare e ciò fa da stimolo.

L'altro punto iniziale è costituito dagli epatociti stessi che producono aldeidi, perossidazione lipidica e ciò "eccita" le cellule di Hito a trasformarsi in miofibroblasti che producono collagene (> matrice extracellulare, > collagene di tipo interstiziale). Le stesse cellule che producono collagene producono enzimi che lo degradano (metalloproteinasi o MMP); vi sono poi inibitori di questi enzimi (TIMP). Importante a tal punto la caratterizzazione delle proteasi (difesa) ed il bilanciamento tra MMP e TIMP. Tra le metalloproteinasi (MMP) di una in particolare, la MMP-9, coinvolta nei processi di rimodellamento fibrogenetici, sono stati esaminati i livelli plasmatici e l'immunolocalizzazione epatica (nelle biopsie

epatiche) nei pazienti con NASH ai fini di valutarne l'utilità diagnostica per la valutazione della fibrosi in pazienti con epatopatia cronica. In generale c'è da dire che MMP sono aumentate in corso di patologie che inducono fibrosi e per quanto concerne la MMP – 9 l'immunolocalizzazione a livello bioptico ha evidenziato differenze nei pattern di immunotipizzazione a seconda del tipo di epatopatia cronica. Infatti è stato visto che mentre in corso di epatopatia cronica HCV correlata la fonte di MMP – 9 è costituita da epatociti e cellule dell'epitelio biliare, nell'epatopatia da NASH l'MMP-9 era localizzata per lo più nei neutrofili e cioè perché verosimilmente sono questi granulociti che raggiungono le sedi di flogosi sia perché nei tessuti infiammati possono promuovere la rigenerazione epatica. Trattasi quindi di marcatori utili come indicatori indiretti di fibrosi epatica sia da soli che, ancor più, in associazione con altri marcatori e /o con la biopsia epatica rappresentando un buon indice predittivo circa l'evoluzione dell'epatopatia, utile anche per selezionare i pazienti con epatopatia con maggior rischio di progressione fibrotica da sottoporre a biopsia epatica.

Da dire anche che le varie cellule (epatociti, cellule stellate, cellule di Kuppfer) producono citochine di cui si distinguono quelle fibrogenetiche (TNF, interferon β , molecole di adesione).

Il TGF β eccita la formazione di matrice extracellulare, non così la interleuchina 1 è l'INF γ . Ognuna delle citochine ha un antagonista per cui la fibrogenesi dipende dal bilanciamento di sostanze pro e anti fibrogenetiche. La terapia del futuro, quella genica, prevede l'uso di un plasmide vettore in cui si mettono geni in grado di fabbricare proteine (plasmidi che portano l'enzima HGF- epatosaide growth factor). Il meccanismo più probabile sta nel bilanciamento tra accumulo di linfociti helper 1 che sintetizzano INF γ che inibisce la fibrosi e linfociti T helper 2 che sintetizzano interleuchine profibrogenetiche. Quindi:



Tra i marcatori proposti in letteratura per individuare l'inizio del processo fibrotico vi è il propeptide amino-terminale del collagene tipo 1(P-III-P), che sembra in grado di differenziare soggetti con fibrosi o cirrosi da quelli solo con steatosi. Per lo stesso obiettivo sono in studio altri marcatori derivanti dal collagene: peptide carbossile – terminale del pro-collagene tipo 1; prodotti di degradazione del pro-collagene tipo 1.

Tra i metodi oggi disponibili anche per uso routinario è molto interessante il dosaggio dell'acido ialuronico (HA). Vi è infatti una interessante correlazione tra i livelli di HA e istologia epatica. L'acido ialuronico aumenta nel siero in conseguenza della perdita di attività delle cellule endoteliali sinusoidali del fegato; queste cellule posseggono un recettore specifico per HA ed eliminano in condizioni fisiologiche il 90% di quello in circolo. Il dosaggio dell'HA sembra quindi in grado di discernere soggetti con epatopatia non cirrotica dai pazienti cirrotici, risultando così utile nella diagnosi precoce di cirrosi.

La cirrosi sviluppata a seguito della progressione evolutiva della NASH darà luogo ad una prognosi nel tempo sovrapponibile a

quella HCV correlata; si è constatato altresì che essa dà luogo ad ipertensione portale nel 35% dei pazienti la gran parte dei quali presenta questa complicanza entro sette anni. In malattia allo stadio finale circa un terzo dei pazienti muore per insufficienza epatica oppure per ulteriore evoluzione della cirrosi in HCC.

CONTRIBUTO PERSONALE

L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare se le alterazioni del normale sistema ossido-riduttivo biologico causate da un eccesso di produzione di radicali liberi non "bilanciabili" dai sistemi di protezione biochimica (sistemi antiossidanti) possono aver un ruolo nello sviluppo della NASH.

Per fare questo, nei pazienti con steatoepatite abbiamo studiato lo stress ossidativo, misurando i livelli di NO, MDA, 4HNE, i livelli di attività catalitica della superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GSHPx), glutatione transferasi (GST), glutatione reduttasi (GSTR) nel sangue e nel tessuto epatico. Abbiamo inoltre determinato i livelli di alcuni marcatori di flogosi come la proteina C reattiva (PCR) e VCAM – 1 per valutare l'eventuale contemporanea presenza intraepatica di fenomeni flogistici e ossidativi.

Materiali e Metodi.

In totale nello studio sono stati arruolati pazienti con sospetta NASH (Gruppo A; età media: $39,4 \pm 8,1$ anni, 13 femmine e 22

maschi) e 31 soggetti di pari età e sesso (Gruppo B; età media: $37,1 \pm 11,8$ anni, 14 femmine, 17 maschi) come gruppo di controllo. I pazienti con NASH ammessi nel nostro reparto presentavano innalzamento degli enzimi epatici, riscontrato per caso, e diagnosi ecografica di steatosi epatica. I pazienti del gruppo di controllo presentavano steatosi severa rilevata ecograficamente senza rialzo delle transaminasi. La NASH e la NAFLD sono state definitivamente diagnosticate in tutti i pazienti mediante esame istopatologico dopo biopsia epatica. Per la diagnosi di NASH e per escludere altre malattie del fegato possibili, tutti i pazienti con steatoepatite sono stati sottoposti ad un'attenta valutazione clinica e di laboratorio.

Criteri di esclusione

I pazienti e i gruppi di controllo con possibile consumo di alcol.

I pazienti con malattie, storia precedente o attuale di interventi chirurgici gastrointestinali, malnutrizione proteica e storia di uso cronico di farmaci e in particolare di steroidi e derivati.

- Età ≥ 60 anni e la circonferenza vita inferiore a 100 cm (uomini) o 87,5 cm (donna).

- Obesi (con Body Mass Index ≥ 29 kg/m²).
- Diabete di tipo 1. Microalbuminuria, definita come rapporto albumina-creatina > 3.5 con concentrazione proteica urinaria < 200 mg / l (misurato radioimmunologicamente da un campione di prima mattina) e alterato livelli di acido urico.
- Consumo di alcol ≥ 20 g / giorno (valutato mediante colloquio separato con il soggetto, il medico di riferimento, e membri della famiglia), con storia recente di malattia acuta o di eventi cardiovascolari.
- Pazienti con malattie di fegato (diversi da NASH) o con malattie renali (creatinina > 130 micromol / L e clearance della creatinina $< 1,3$ mL/s, dosati con autoanalizzatore), con anti-HCV e HCV-RNA qualitativo rilevato dal test di reazione a catena della polimerasi (PCR Amplicor sistema di Roche Diagnostic System Inc., Brackburg, NJ, USA).
- Pazienti con infezione da HAV e HBV l'infezione (utilizzando come marcatori sierologici per la diagnosi un kit dei laboratori Abbott di Chicago, Illinois, USA), EBV e l'infezione da CMV mediante immunofluorescenza.

- Malattie autoimmuni (presenza di anticorpi antinucleo, antimitocondrio, anti muscolo liscio, gli anticorpi antimicrosomi epatici e renali valutati mediante immunofluorescenza indiretta.

-Storia di dipendenza, Malattia di Wilson (con la concentrazione sierica di α -1 antitripsina), Emocromatosi (mediante la valutazione genetica del gene HFE con Reverse Dot Blot-Real Time PCR / sonde FRET sui leucociti del sangue)

- I soggetti fumatori, i soggetti ipertesi (pressione arteriosa > 130/85 mmHg), i soggetti dislipidemicici (colesterolo HDL <40 mg / dL e trigliceridi > 150 mg / dL con metodo enzimatico), gli individui con calcoli biliari e che assumevano da lungo tempo farmaci, vitamine e antiossidanti, venivano esclusi per evitare, per quanto possibile, comorbidità nelle quali è noto il marcato impegno del sistema ossido-riduttivo. Il BMI è stato calcolato dividendo il peso in chilogrammi per il quadrato dell'altezza in metri quadri. Circonferenza vita (la più ampia tra il margine inferiore costola e la cresta iliaca) e la circonferenza fianchi (la più ampia sul grande trocantere) sono stati misurati e utilizzati per calcolare il rapporto vita-fianco, come indice di distribuzione

regionale del grasso. La pressione sanguigna è stata misurata con un manometro a mercurio standard (media di tre letture consecutive in posizione di regolazione sul braccio destro, dopo 5 min di riposo).

Informazioni sul consumo di alcol al giorno, e altre caratteristiche dello stile di vita sono state ottenute da tutti i partecipanti durante il periodo di controllo. Il sangue venoso è stato prelevato a digiuno. I tests plasmatici di funzionalità epatica, insulinemia, e di altre analisi di sangue sono state determinate dalle nostre procedure standard di laboratorio. L'emoglobina glicosilata (HbA1) è stata determinata mediante cromatografia a scambio ionico. I range di riferimento per livelli sierici di ALT, i livelli di AST e γ GT, nel nostro laboratorio, sono stati $> 35\text{mU/ml}$, 35mU/ml e 50mU/ml $<$, rispettivamente). Il colesterolo LDL è stato calcolato con l'equazione di Friedewald's.

L'intolleranza al glucosio (IGT) e diabete mellito di tipo II sono stati diagnosticati secondo i criteri dell'American Diabetes Association. I soggetti con IGT presentavano livelli di glucosio a

digiuno ≥ 110 mg / dL (6.1mmol / l) ma <126 mg / dL di glucosio (7mmol / L) e con un 2 ore dopo il pasto ≥ 140 (7.8mmol / l) e <200 mg / dL indice (11.1mmol / L). L'insulino-resistenza è stato calcolata con l'indice di HOMA (calcolato con la formula: insulinemia a digiuno (IU / mL) moltiplicato glicemia a digiuno nel siero (mmol / L) e divisa per 22,5. I pazienti erano insulino resistenti quando l'indice HOMA resistenza era > 2 .

2. L'esame del fondo dell'occhio con oftalmoscopia (eseguito dallo stesso medico oculista) per escludere i soggetti con microaneurismi o emorragie, o essudati lipidici. La presenza di steatosi epatica è stata diagnosticata mediante ecografia con sonda lineare convessa ad alta risoluzione (7,8 MHz) (Acuson Corporation. Mountain View. CA. Stati Uniti), dallo stesso operatore, che non conosceva tutti i dati clinici e di laboratorio dei partecipanti, in base ai criteri convenzionali (cioè, l'evidenza di incremento diffuso dell'ecogenicità del fegato rispetto a quella dei reni). Misurazioni ripetute sugli stessi soggetti risultavano con coefficienti di variazione (CV) $<1\%$.

Istologia. La biopsia epatica (un nucleo di almeno 1,5 cm di lunghezza è stato necessario per essere considerato minimamente adeguato per l'interpretazione istopatologica) è stata eseguita in tutti i soggetti con tecnica modificata di Menghini senza eco guida nei pazienti con aumento di ALT (e / o γ GT) e con diagnosi di steatosi. I campioni biotici sono stati subito posti in formalina tamponata al 10% con paraffina e selezionati in serie. Ogni biopsia è stata analizzata in sezioni, colorate con ematossilina e eosina, acido periodico Schiff con diastasi (PAS-D); il grado di attività (punteggio 0-18) e di fibrosi (punteggio 0-6) è stato valutato nei campioni biotici da un unico patologo che non conosceva i dati clinici e di laboratorio del paziente, secondo il punteggio Brunt utilizzato negli studi clinici; il sistema di punteggio comprendeva 14 caratteristiche istologiche, di cui 4 sono state valutate semi-quantitativamente: la steatosi (0-3), flogosi lobulare (0-2), rigonfiamento epatocellulare (0-2), e la fibrosi (0-4). La diagnosi di NASH necessitava la presenza di steatosi, infiammazione parenchimale e rigonfiamento cellulare, la degenerazione degli epatociti con fibrosi, e corpi di Mallory.

Livelli di NO. NO è un composto labile, ha una breve emivita ed è rapidamente convertito in prodotti finali stabili, nitriti e nitrati, in soluzioni acquose ossigenate. I livelli sierici di nitrito sono stati calcolati con il metodo colorimetrico basato sulla reazione di Griess in cui viene fatto reagire sulfanilamide e N-(1-naphthyl)etilendiammina per produrre un colorante azoico rilevato a 540 nm. I livelli di nitriti sono stati misurati dopo la riduzione enzimatica dei nitrati a nitriti con nitrato reductasi. Soluzione di nitrito di sodio è stato utilizzato per le misure standard. I livelli di nitrito nel siero sono stati espressi in mmol / L.

Livelli di ossidazioni. È stata misurata la concentrazione di plasma malondialdeide (MDA) con un HPLC Jasco (Giappone) utilizzando una colonna C18 trattata (lavata con acqua e acetonitrile 85:15, dopo incubazione con acido tiobarbiturico). Un metodo spettrocolorimetrico (LPO-586 Bioxytech) è stato utilizzato per misurare la concentrazione di 4-idrossinonenale (4-HNE).

Determinazioni enzimi antiossidanti. Per valutare le attività di SOD, GSHPx, GSH sono stati utilizzati eritrociti emolizzati con

l'aggiunta di acqua distillata gelida (1:10). Le membrane cellulari sono stati rimosse mediante centrifugazione ed il sovrinatante utilizzato per l'analisi. SOD e GSHPx sono stati determinati rispettivamente da kit Ransod e Ransel (della Randox Laboratories Ltd., UK), e l'attività del GR con un kit commerciale per glutatione reduttasi Sigma Chemical, Saint Louis, MO, USA). L'attività di GSH è stata determinata utilizzando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come co-substrato. Brevemente, 20 ml di emolisato è stato aggiunto 1 mL (volume finale) di 0,1 mol / L tampone potassio fosfato (pH 6,5), contenente 2 mmol / L CDNB e 1 mmol / L GSH. La reazione è stata monitorata a 340 nm ($\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizzando un metodo spettrofotometrico (Lambda Bio 20; Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, USA).

Determinazione dopo istologia. La presenza e la concentrazione di ossidanti (MDA, 4-HNE) e antiossidanti (SOD e GSH) sono state valutate con gli stessi metodi su omogenati di tessuto epatico ottenuto dalle biopsie.

Marcatori di infiammazione. La proteina C-reattiva (CRP) è una proteina riscontrabile in processi flogistici in fase acuta. Questa è stata misurata utilizzando un saggio colorimetrico immunoenzimatico ultrasensibile.

La molecola di adesione delle cellule vascolari-1 sierica (VCAM-1) può rappresentare un biomarker importante per i processi infiammatori che promuovono danni alle cellule. Questa è stata misurata mediante test ELISA (R & D System Europe, Abington, UK), dopo centrifugazione di sangue intero raccolto in 0,13 M citrato di sodio.

Analisi statistica. La valutazione statistica è stata effettuata mediante sistemi computerizzati SPSS 11.0 (pacchetti statistici per le scienze sociali, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). I dati ottenuti dai gruppi di studio sono stati confrontati con test di Student; analisi di correlazione tra le variabili sono state fatte con test di Pearson; valore di p inferiore a 0,05 è stato considerato come statisticamente significativo. Tutti i risultati sono stati espressi come media con la loro deviazione standard (media \pm DS).

Risultati.

L'esame istopatologico ha rivelato che 23 dei pazienti del gruppo A erano di grado 1, otto pazienti grado 2 e quattro i pazienti erano di grado 3.

Nel gruppo B sono stati esclusi 6 pazienti diagnosticati come NASH di grado 1. Sono stati dunque utilizzati 25 pazienti dove l'esame istopatologico ha rivelato la presenza di NAFLD.

I livelli sierici di NO, SOD, GSHPx, GSH erano più bassi nei pazienti con NASH rispetto ai controlli ($p < 0,001$, $p < 0,019$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, rispettivamente) mentre marcatamente più elevati sono risultati i livelli di ossidanti MDA ($p < 0,05$) e 4-HNE ($p < 0,05$).

I livelli di CRP, VCAM-1 sono risultati più alti nei pazienti con NASH rispetto al gruppo in buona salute (rispettivamente $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,05$). Non c'era una significativa correlazione tra il grado di NASH e i livelli delle determinazioni ematologiche. (vedi tabelle).

Discussione

La patogenesi della steatoepatite non è ancora stata chiarita, ma

l'eccessivo accumulo di grasso nel fegato e lo sviluppo di stress ossidativo sembrano essere responsabili dell'inizio dei fenomeni necroinfiammatori. Lo stato redox del glutatione nel sangue è ritenuto importante per molte indagini rivolte a tentare di correlare stress ossidativo e patologie tissutali da radicali liberi. La concentrazione plasmatica ed eritrocitaria di GSH può essere bassa nei pazienti con cirrosi, o essere in relazione ad assunzione acuta o cronica di alcol. Nella steatosi epatica non alcolica, GSH nel fegato può essere anormalmente basso e GSSG alto. Nell'epatite virale possono essere diminuiti i livelli di GSH, e nei pazienti con epatite C, i livelli di GSH monocitari sono stati riscontrati diminuiti.

Nei nostri pazienti con NASH è stato riscontrato un costante aumento del GSH ossidato e GSHP_x nel sangue che suggerisce uno stress ossidativo sistemico della malattia. Ciò risulta in associazione a livelli di MDA, 4-HNE che abbiamo segnalato in netto aumento nel plasma dei nostri pazienti. Abbiamo rilevato diminuiti valori di NO.

Le funzioni fisiologiche di NO vengono annullate dal radicale superossido e stabilizzate da antiossidanti come la SOD e GSHPx. L'NO che ha breve durata e il radicale superossido moderatamente reattivo danno luogo alla formazione di un potente ossidante di lunga durata, il perossinitrito da cui deriva poi un radicale idrossile, con conseguente aumento dello stress ossidativo. La presenza di valori elevati di ossidanti può avere perciò determinato un consumo di NO attraverso questi meccanismi biochimici. Un'altra possibile spiegazione del diminuito livello sierico di NO potrebbe essere l'aumentata produzione di radicali liberi con difettosi meccanismi di difesa antiossidanti in steatoepatite, che può indurre danni direttamente alle cellule endoteliali, e quindi causare diminuzione della produzione di NO da sintesi endoteliale.

L'alterato metabolismo del superossido, a causa della progressiva diminuita attività da consumo della SOD e GSHPx, sembra essere importante nella patogenesi della NASH.

Lo stress ossidativo, che può giocare un ruolo nella patogenesi della NASH, produce ROS e induce perossidazione lipidica

incontrollata. Le membrane cellulari sono costituite principalmente da lipidi, e quindi la perossidazione lipidica può causare lesioni e morte cellulare. I sistemi di difesa cellulare contro la perossidazione lipidica indotta dai radicali liberi sono costituiti da molecole antiossidanti scavenger dei radicali liberi come il SOD e GSHPx.

La concomitante diminuzione di SOD e GSHPx comporta per primo un accumulo di radicali O_2 e al secondo step di H_2O_2 . I gruppi tiolici hanno principalmente un ruolo nel regolare i sistemi antiossidanti intracellulari. Nel nostro studio abbiamo riscontrato che i livelli totali di tioli sierici erano significativamente più bassi nei pazienti con NASH rispetto al gruppo di controllo. Questa diminuzione potrebbe essere in risposta alla continua produzione di ROS, e alla relativa necessità della loro neutralizzazione da parte dei tioli. Infatti è dimostrato in laboratorio che i tioli composti così come i glutatione e N-acetysisteina reagiscono attivamente e neutralizzano il perossido di idrogeno, prevenendo il danno ossidativo cellulare.

Infine sono da segnalare gli aumenti costanti (rispetto ai controlli) dei marcatori di flogosi da noi utilizzati (PCR e VCAM-1) a testimoniare il coinvolgimento della componente flogistica. Ancora confrontando i valori ottenuti nell'analisi degli omogenati di tessuto epatico nei soggetti con NASH rispetto ai soggetti con NAFLD appare significativamente rilevante la differenza riscontrata tra i due gruppi con valori più elevati di ossidanti e valori più bassi di antiossidanti nei pazienti con NASH (vedi tabelle).

CONCLUSIONI

La potenziale attività lesiva dei RL viene fisiologicamente bilanciata da un efficace sistema di difesa “redox” ma la presenza di sostanze potenzialmente ossidanti può sbilanciare tale delicato equilibrio ossido-reduttivo superandone quantitativamente la possibilità di difesa. In tal senso il nostro lavoro ha evidenziato nei pazienti con NASH elevati livelli di ossidazione attraverso l'aumento delle concentrazioni di diverse sostanze, una fra tutte la malonilaldeide (MDA) che è poi la sostanza “stabile” derivata dai radicali idroperossidi. Infatti la sua concentrazione nei liquidi biologici indica, con buona approssimazione, l'entità della attività radicalica e del conseguente danno ossidativo. Sappiamo che il danno cellulare da RL, definito anche come “effetto da stress ossidativo” può essere bloccato o prevenuto da un sistema di sostanze di natura biochimica diversa ma con comuni proprietà antiossidanti e presenti in concentrazioni variabili nei sistemi biologici. Tra questi i sistemi enzimatici presi in considerazione nel nostro studio hanno per lo più evidenziato diminuzione dei

loro livelli in corso di NASH. Quanto detto ci fa credere che nei pazienti con questa patologia vi sia un aumento dello stress ossidativo con una importante alterazione del balance ossido-reduttivo.

A tale aumento fa riscontro una elevazione dei marcatori di flogosi da noi considerati. Dunque, riteniamo che ossidazione e flogosi siano fenomeni presenti e caratterizzanti lo stato di portatore di NASH e pertanto riteniamo potenzialmente utili eventuali, possibili interventi terapeutici mirati alla correzione di tali fenomeni patologici che agiscono in sinergia con una terapia più generale mirata alla correzione dello stato di insulino-resistenza.

BIBLIOGRAFIA

Adams M.A., Lymp GF, ST Sauver Jey, Sanderson SO, Lindor Kd, Feldstein A, Angulo P. The natural story of non – alcoholic fatty liver disease; a population based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 113-121.

AJ. Sanyal, C. Campbell – Sargent, F. Mirshashi, W.B. Rizzo, M.J. Contos and R.K. Sterling et al. Non alcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192.

Altamore E., Vendemiale G., Alono O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver disease. *Life Sci* 1998; 43: 991-998.

American Diabetes Association Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27: S5-S10.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-231.

Bacon BR, Farahvash MJ, C.G. Janney, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.

Basu S. Isoprostanes: novell bioactive products of lipid peroxidation, *Free Radic Res* 2004; 38: 105-122.

Bonora E., Thargher G., Formentini G., Calcaterra F., Lombardi R., et al. The metabolic syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabet Med* 2004;21:52-58.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152.

Chang CY., Argon CK., AL – Osaimi AM, Caldwell SH.
Therapy of NAFLD: antioxidation and cytoprotective agents. J
Clin Gastroenterol 2006; 40:51:60.

Clark I., Swingler TE., Sampieri CL., Edwards Dr., The
regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors.
Int J Biochem Cell Biol 2008; 40: 1362-78.

Cortez - Pinto H., de Moura MC Day CP.

Non – alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical
practice. J Hepatol 2006; 44: 197-208.

D.E. Paglia and WN Valentine, Studies on the quantitative and
qualitative characterization of erythrocyte glutathione
peroxidase. J lab Clin Med 1967; 70: 158-169.

Esterhoner H, Cheeseman kH. Determination of aldehydic lipid
peroxidation products: malonaldehyde and 4 – hydroxynoneal
Methodos Enzymal 1990;18-407.

Fiotti N., Giansante C., Ponte E., Del Bello C., Calabrese S., Zacchi T., et al. Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 1999; 145: 51-60.

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen Lk, Kumpusalo E, Tuomilehto J., et al. The metabolic syndrome and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002; 288: 2709-2716.

Macy e Hayes T., Tracy R., Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implication for reference interval and epidemiological applications, *Clin Chem* 1997; 43: 52-60.

Marchesini G., Bugianesi E., Forlani G. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis and metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-923.

Koruk M., Tayasi S., Savas MC, Yilmaz O, Akcay F., Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34; 57-62.

Medina J., Fernandez-Salazar LI, Gorcia-Buey L, Moreno-Otero R. Approach in the pathogenesis and treatment of nonhalcolic steatohepatitis. *Diabetes Core* 2004; 27: 2057 -2066.

Nobili V., Pastore A., Gaeta L.M., Tozzi G., Comparcola D., Santarelli M.R., Marcellini M., Bertini E. Piemonte F.

Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by non – alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2005; 355: 105-111.

Park Ks., Jang B, Kwon KM, Chump WJ, Cho KB, Hwang JS. Antioxidant status in nonalcoholic steatohepatitis. *Korean J. Hepatol* 2005; 11: 135-143.

Saalbach A., Arnol J., Lessing J., Simon JC., Anderegg U.,
Human $\text{th}y - 1$ induces secretion of matrix metalloproteinase - 9
and CXCL from human neutrophils. Eur J Immunol 2008;
38:1392-403.

Shifflet A. Wu Gy. Non Alcoholic Steatohepatitis: an overview.
J Formos Med Assoc 2009; 108: 4-12.

Sun Y., Oberley LW, Li YA. A simple method for clinical assay
of superoxide dismutase. Clin chem. 1988; 34: 47-500.

Targher G., Bertolini L., Padovani R., Rodella S., Zapini G.,
Zenari L., et al. Relation Between carotid artery wall thickness
and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver
disease. Diabetes care 2006; 29: 1325-1330.

Tiniakos DG. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic
steatohepatitis patients. Gastroenterologie Clinique Biologique
2009; 33: 930-939.

Yakaryilmaz F., Guliter S., Savas B., Erdem O., Akyol G., Bozkaya H and Ozenirler. Effect of vitamin E treatment on proliferator. Activated receptor a expression and insulin resistance in patients with non alcoholic steatohepatitis: results of a pilot study Internal Medicine Journal 37 (2007) 229-235.