**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ**

# Д-р Вера Начева Карамфилова

**Нови биохимични и генетични маркери при неалкохолна стеатозна болест със затлъстяване и предиабет**

# ДИСЕРТАЦИЯ

**София 2019**

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ**

**КЛИНИКА ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ И БОЛЕСТИ НА ОБМЯНАТА**
**УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“**

---

**Д-р Вера Начева Карамфилова**

# Нови биохимични и генетични маркери при неалкохолна стеатозна болест със затлъстяване и предиабет

## <u>ДИСЕРТАЦИЯ</u>

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

по клинична специалност Вътрешни болести

**Научни ръководители:** Проф. Здравко Асенов Каменов, д.м., д.м.н.

Проф. Людмила Матева Владимирова, д.м., д.м.н.

**София**

2019

# Съдържание

# ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АЛТ – аланин-аминотрансфераза

АСТ - аспартат-аминотрансфераза

АХ – артериална хипертония

ГГТ – гама-глутамил-транспептидаза

ДАГ- диацилглицерол

ДАН – диастолно артериално налягане

ЕПР –ендоплазматичен ретикулум

ЗД2 – захарен диабет тип 2

ИР – инсулинова резистентност

ИТМ – индекс на телесна маса

КЗ – кръвна захар

МС – метаболитен синдром

НАСБ – неалкохолна стеатозна болест

НАСХ – неалкохолен стеатозен хепатит

НГГ – нарушена гликемия на гладно

НГТ – нарушен глюкозен толеранс

ОГТТ – орален глюкозотолерансен тест

ОХ – общ холестерол

САН – систолно артериално налягане

СМК – свободни мастни киселини

ССЗ –сърдечно-съдово заболяване

ТАГ- триацилглицерол

ТГ – триглицериди

ABI - Ankle-Brachial Index, индекс глезен/мишница

APRI - AST to Platelet Ratio Index,  индекс АСТ/тромбоцити

ARGF – Ангиопоетин свързан растежен фактор

EASD - European Association for the Study of Diabetes

EASL - European Association for the Study of the Liver

EASO- European Association for the Study of Obesity

ELF - Enhanced Liver Fibrosis

HDL – липопротиени с висока плътност

HOMA-IR - Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance

IMT – Intima Media Thickness, интима медиа дебелина

FGF 21 - Фибробластен растежен фактор 21

FIB-4- Фиброза стадиий -4

LDL - Липопротеини с ниска плътност

NDS - Neuropathy disability score, индекс за  невропатия

NFS - NAFLD fibrosis scor

PNPLA3 – Patatin-like phospholipase domain-containg protein 3

PTX3 – Пентраксин 3

RBP4 - Ретинол свързващ протеин 4

SHBG – Секс- хормон свързващ глобулин

TM6SF2- Transmembrane 6 Superfamily Member 2

VAI - visceral adiposity index; индекс за висцерално затлъстяване

VLDL – липопротеини с много ниска плътност

WHR - Waist-to-hip ratio - Отношението талия/ханш

WSR - Waist-to-stature ratio - Отношение талия/ръст

WISP- 2 - Wnt1-inducible signaling pathway protein-2

# I. Въведение

Неалкохолната стеатозна болест (НАСБ) е най-честото чернодробно заболяване в световен мащаб. Честотата й нараства успоредно с увеличаването на затлъстяването и метаболитния синдром (МС). НАСБ е пряко свързана с инсулиновата резистентност. Включва широк спектър от различни по тежест чернодробни промени, формиращи континиума на НАСБ: неалкохолна стеатоза (НАС), неалкохолен стеатозен хепатит (НАСХ) с или без фиброза, цироза и хепатоцелуларен карцином. С НАСБ се асоциира и континиума на захарния диабет тип 2 (ЗД2): генетична предиспозиция, епигенетични фактори, затлъстяване и МС, предиабет, диабет, усложнения на диабета и повишен сърдечно-съдов риск. Клиничната изява, тежестта и естествената еволюция/прогресия на НАСБ са различни и зависят от редица фактори от околната среда и генетичната предиспозиция. Лицата с НАСБ са с намалена преживяемост, като смъртността е свързана както с усложненията на чернодробната цироза и хепатоцеуларния карцином, така и със ССЗ или появата на неоплазми. Различни неинвазивни сурогатни маркери, включително генетични, за предсказване на фиброзата и нейната степен, риска от прогресия до цироза, хепатоцелуларен карцином или тежки метаболитни нарушения се изследват усилено с цел профилактика, мониториране и лечение. Въпреки това, до този момент доказателствата за приложението им в рутинната практика са малко. Препоръчват се по-нататъшни проучвания.

Разбирането на връзката между НАСБ, затлъстяването, нарушенията във въглехидратната обмяна и ССЗ ще допринесе за разработване на по-ефективни стратегии за ранно откриване и лечение както на НАСБ, така и на предиабета и неговите усложнения. Отношенията на разгърнатата НАСБ/НАСХ и ЗД2 са добре проучени. Налагащата се в съвременната медицина тенденция към все по-ранна интервенция с оглед възможности за превенция предполага изучаване на тези болести в най-ранните им клинични етапи – неалкохолната стеатоза и предиабета. Данните в литературата за връзката между тези ранни етапи са изключително малко.

# I. Литературен обзор

## 1. Увод

НАСБ се характеризира с натрупване на масти (триглицериди) в над 5% от хепатоцитите, асоциирано с инсулинова резистентност (ИР) – (първична НАСБ), но съществуват и други причини за появата й (вторична НАСБ). Тясно свързана е и с метаболитния синдром [32].

НАСБ е сборно понятие и включва следните патологични състояния (категории):

1. Неалкохолна чернодробна стеатоза (НАС)
    1.1 Стеатоза
    1.2 Стеатоза с леко лобуларно или портално възпаление; стеатоза с изолирано балониране
2. Неалкохолен стеатозен хепатит (НАСХ), който включва съчетанието от стеатоза, хепатоцелуларно увреждане (балониране) и лобуларно възпаление, и може да прогресира до напреднала фиброза (F), чернодробна цироза (ЧЦ) и хепатоцелуларен карцином (ХЦК)
    2.1 Ранен НАСХ (F0-F1)
    2.2 НАСХ със значима (> F2) или напреднала (> F3) фиброза
    2.3 НАСХ-цироза (F4)
    2.4 ЧЦ без хистологични белези за НАСХ (НАСХ в регресия), но с метаболитни рискови фактори
    2.5 ХЦК ± ЧЦ, хистологични белези за НАСХ (НАСХ в регресия), но с метаболитни рискови фактори

Метаболитните изяви на заболяването включват повишен риск от развитие/влошаване на МС, ЗД2 и ССЗ.

Диагнозата на НАСБ се поставя най-често на базата на ехографски установена стеатоза и наличие на ИР и/или метаболитни отклонения при изключване на други причини за заболяването като анамнеза за значима консумация на алкохол (≥ 30 g абсолютен алкохол дневно за мъжете и ≥ 20 g абсолютен алкохол за жените) или друга причина за вторична стеатоза (вродени метаболитни заболявания, хроничен хепатит или прием на медикаменти със стеатогенен ефект). Чернодробните ензими, особено АЛТ и ГГТ могат да бъдат повишени, но нормалните стойности не изключват НАСХ или напреднала фиброза. Окончателната диагноза НАСХ изисква чернодробна биопсия с последващо хистологично изследване. Определянето на степента на фиброзата е от критично значение за прогнозата на заболяването.

Множество неинвазивни маркери и скорови системи са предложени за отдиференциране на прогресивната от непрогресивна НАСБ, но засега се използват само за селекциониране на болните с предполагаемо по-тежко чернодробно увреждане, т.е. показани за извършване на чернодробна биопсия. Най-голяма надежда днес се възлага на генетичните предиктори за предсказване на тежеста и еволюцията на чернодробната болест и метаболитните отклонения. **Необходими са бъдещи проучвания за селекциониране на нови маркери с по-добра предсказваща стойност за НАСХ и клинично значима фиброза.**

НАСБ представлява значителен здравен проблем с големи здравни разходи и смъртност, който засяга милиони хора по света. Тя е най-честата форма на хронично чернодробно заболяване в западните страни като честотата й непрекъснато нараства, паралелно с тази на МС, затлъстяването и ЗД тип 2 [33]. Точното й разпространение обаче, не е установено тъй като големите епидемиологични проучвания не са проведени на база хистологично изследване и не могат да идентифицират пациентите с НАСХ и тези с фиброза. **Честотата** на НАСБ варира от 17% до 46% сред населението в зависимост от изполазния диагностичен метод (ехография, чернодробни ензими), пол, възраст и етническа принадлежност [32]. **Заболяват** от 20 до 86/1000 лица годишно на база ехографски установена стеатоза или повишени чернодробни ензими. **Засяга всички възрастови групи**, включително и деца, с най-голяма честота във възрастта 40-49 г, както при мъжете, така и при жените [34]. НАСБ се установява в до 7% и при хората с нормално тегло [35]. Делът на **НАСХ** днес достига до 26% сред лицата с НАСБ. Както НАСБ, така и НАСХ са много по-чести при затлъстяване, МС, ЗД2 и ССЗ (над 70%). При жените в по-млада възраст с нормални чернодробни ензими е възможна прогресия на заболяването до напредналите стадии на НАСХ [36].

Лицата с НАСБ са с **намалена преживяемост**. Смъртността се дължи както на прогресията на чернодробното заболяване, така и на сърдечно-съдовите усложнения или появата на неоплазми. Въпреки това, необходимостта от масов скрининг до този момент е оспорвана, предвид високите разходи от изследванията, ниската предиктивна стойност на неинвазивните тестове, рискът от чернодробна биопсия, както и липсата на ефективно лечение [37].

От друга страна прогресивните форми на НАСБ до НАСХ, особено свързани с напреднала фиброза трябва да бъдат активно търсени при пациенти с повишен риск - възраст >50 години, ЗД2 или МС. Според *EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of NAFLD от 2016 г.* скринингът за НАСБ, особено НАСХ и фиброза е задължителен при лица със затлъстяване, МС, ЗД2 и ССЗ и обратно – тези заболявания трябва да бъдат търсени при всички форми на НАСБ.
Около 75% от пациентите със ЗД2 имат някаква степен на НАСБ, като 72.5% от хората с МС и нормални трансаминази също са с НАСБ, 32.5% от тези случаи имат и значима фиброза и 10% са с цироза [33].

**Метаболитните рискови фактори за НАСБ включват компонентите на МС** [38]

- централен тип затлъстяване (обиколка на талия ≥ 94 см за мъже, ≥ 80 см за жени от европеидната раса)
- глюкоза на гладно ≥ 5.6 mmol/l или лечение за ЗД2
- триглицериди >1.7 mmol/
- HDL холестерол <1.30 mmol/l за жените и <1.03 mmol/l за мъжете
- артериално налягане ≥ 135/80 mmHg или лечение за артериална хипертония.

Връзката на НАСБ с елементите на МС е една от причините за големия интерес относно възможната роля на НАСБ за развитие на атеросклероза и съдови усложнения, в основата на които е инсулиновата резистентност. Това се дължи от една страна на непрекъснато увеличаващата се честота на НАСБ (в частност НАСХ) и свързаната с тях повишена сърдечно-съдова заболеваемост и смъртност. Въпреки многобройните научни изследвания, обсъждащи ролята на НАСБ за по-ранна атеросклероза и повишен риск от ИБС и мозъчно-съдова болест, все още редица клинично важни проблеми относно честотата, спектъра на промени, диагнозата, профилактиката и лечението остават нерешени. По данни от дисертационния труд на Р. Иванова честотата на кардиометаболитните рискви фактори при българските пациенти с НАСБ е както следва: затлъстяване - 50%, наднормено тегло – 40%, МС - 46%, абдоминално затлъстяване - 91%, артериална хипертония – 59%, предиабет - 38%, ЗД 2 – 19%, и HOMA-IR > 2 - 82% [7].

Черният дроб има важна роля в контрола на системното възпаление и атеротромбозата чрез освобождаването на различни цитокини (хепатокини) и коагулационни фактори, а също и чрез ефектите на органокините, секретирани от него и от висцералната мастната тъкан. При пациентите с НАСБ в сравнение с контролни лица без стеатоза се установяват по-високи нива на редица биомаркери на атеросклерозата, като CRP, фибриноген, трансферин, тумор некротизиращ фактор-α (TNF-α), интерлевкин -6 (IL-6), резистин, инхибитор на плазминогеновия активатор -1 (PAI-1) и ангиотензиноген, които нарастват с развитието и тежестта на чернодробното увреждане [39,40]. Прогресията на НАСБ увеличава общата и чернодробната ИР, дислипидемията, хипергликемията, възпалението и освобождаването на токсични свободни радикали и мастни киселини, които заедно с прокоагулационните фактори допринасят за напредване на съдовото увреждане (възпаление) и атеросклероза [7, 39].

Данните от литературата показват сложната и комплицирана връзка между НАСБ и компонентите на МС. Очевидно тези състояния споделят много аспекти от своята патофизиология, като инсулиновата резистентност е в центъра и на двата процеса. Налице са достатъчно доказателства не само за двустранната връзка между МС и НАСБ, но и как всеки от тях действа като поддържащ или акцелериращ фактор за другия.

## 2. Характеристика на НАСБ при затлъстяване, метаболитен синдром и захарен диабет

### 2.1 Връзка на НАСБ със затлъстяването

Затлъстяването е световен здравен проблем, който засяга милиони души по света и е водеща причина за редица заболявания, включително НАСБ [41].

Световната Здравна Организация (СЗО) дефинира наличието на наднормено тегло при ИТМ >25 kg/m$^2$ , а затлъстяване – при ИТМ >30 kg/m$^2$ за Европеидната раса (Табл. 1) [42].

**Табл. 1** Класификация на телесното тегло, съобразено с ИТМ и асоциацията му с болестността и смъртността (СЗО 2000)

| ИТМ кг/м$^2$ | Класификация | Риск от заболявания |
|---|---|---|
| <18.5 | поднормено тегло | повишен |
| 18.5-24.9 | нормално тегло | нормален |
| 25-29.9 | наднормено тегло | повишен |
| 30-34.9 | затлъстяване I ст. | висок |
| 35-39.9 | затлъстяване II ст. | много висок |
| ≥40.0 | затлъстяване III ст. | екстремно висок |

Възприетите граници за ИТМ са развити на базата на мащабни проучвания за връзката на ИТМ с болестността и смъртността (СЗО,2000). Те са възрастово независими и еднакви за двата пола. Американската Сърдечна Асоциация препоръчва използването на допълнителни подгрупи при пациентите с високостепенно затлъстяване: степен IV- отговаряща на ИТМ >50 kg/m$^2$ и степен V – на ИТМ > 60 kg/m$^2$. По-ниски граници за ИТМ за категоризиране на телесното тегло се препоръчват за популациите от Южна Азия, Китай и Япония: наднормено тегло се приема при ИТМ < 23 kg/m$^2$ и затлъстяване при ИТМ > 27.5 kg/m$^2$ (СЗО, 2000).

Последните епидемиологични данни на СЗО (2014) сочат, че над 1.9 млрд. от възрастното население на Земята (над 18 г.) са с наднормено тегло (39%), а над 600 млн. са със затлъстяване (13%). По данни на Европейската Асоциацияза изучаване на затлъстяването (EASO) 23.7% от възрастното население в България е със затлъстяване, 34.5% е с наднормено тегло или 58,2% от хората са или със затлъстяване или с наднормено тегло [1]. По данни на А-М Борисова и сътр. от 2016 г. в България 33.2% от населението над 20-годишна възраст е със затлъстяване, което е значимо по-често при мъжете, отколкото при жените (38.8% срещу 28.3%, $p<0.001$) [1].

Затлъстяването увеличава риска от редица хронични заболявания, включително ЗД2, ССЗ, малигнени заболявания, обструктивна сънна апнея и др. То се свързва не само с обикновената стеатоза, но и с НАСХ, НАСХ- свързаната цироза и хепатоцелуларния карцином [43]. Предвид на все още липсата на одобрени медикаменти за лечение на НАСБ, контролът на затлъстяването е от изключително важно значение за нейното повлияване. НАСБ се изявява предимно при абдоминалния тип затлъстяване, което се характеризира със субклинично системно възпаление. Това нискостепенно инфламаторно състояние повлиява метаболизма на липидите и индуцира промени в продукцията на адипокините от мастната тъкан, които нарушават нормалната инсулинова функция и индуцират ИР. Честотата на НАСБ при обезни пациенти с ИР и/или ЗД2 нараства значително и достига от 30% до 100 % [44,45]. В азиатско-тихоокеанския регион честотата на НАСБ сред обезни лица е между 10% и 80% като тя е по-ниска в Корея (10-50%) и по-висока в Япония (50-80%), както и в Китай (70-80%) [46]. В Италия честотата на НАСБ възлиза на 75.8% сред затлъстелите лица и 16.4% при лица без затлъстяване, което се равнява на 4.6 пъти по-висок релативен риск при наличие на затлъстяване (Dionysos study) [47].

Затлъстяването е независим рисков фактор за НАСБ, без значение от наличието на другите компоненти на МС. В мащабно кохортно проучване с приблизително 77.500 метаболитно здрави индивиди без НАСБ в началото, тези с наднормено тегло (съотношение на риска 2.2) и затлъстяване (съотношение на риска 3.6) са били с повишен риск за НАСБ в сравнение с лицата с нормално телесно тегло след проследяващ период от 4.5 години [48].

Независимата връзка между затлъстяване и НАСБ е валидирана с два големи метаанализа съдържащи съответно 21 кохортни и 21 обсервационни проучвания [49]. Стойностите на обобщеното отношение на шансовете при повишаване с една единица на талията и на ИТМ е 1.07 (95% CI: 1.03-1.10, $I^2$ = 73.9%) и 1.25 (95%CI: 1.13-1.38, $I^2$ =

88.7%), съответно. Заключението на авторите е, че централното затлъстяване може да представлява по-голяма заплаха за здравето в сравнение с общото затлъстяване, въпреки че и двете са независимо свързани с повишен риск за НАСБ. Затлъстяването е свързано с 3.5 -кратен повишен независим релативен риск за НАСБ в сравнение с лицата с нормално телесно тегло. Това може също да означава потенциално двупосочна връзка между НАСБ и затлъстяването, като НАСБ може също да повлияе на затлъстяването чрез множество механизми, включително чернодробна дисфункция, чернодробна ИР, оксидативен стрес, глюкотоксичност и липотоксичност [43].

### 2.2 Връзка на НАСБ с метаболитния синдром

МС е съвкупност от клинични рискови фактори, които повишават индивидуалния риск от ССЗ, инсулт, бъбречно заболяване и ЗД2 [38]. МС е изследван многократно в различни страни и в различен аспект – разпространение, зависимост от пол, възраст, семеен и личен доход, ниво на образование, стил на живот – хранене, заседнал живот, продължителност на съня и други фактори. Разпространението на МС в българската популация е 35,7%, значимо по-често сред мъжете – 40,9%, отколкото сред жените - 31,1%, $p<0.001$ [4]. Честотата на МС в България е подобна на тази в другите страни.

Традиционно НАСБ се счита за чернодробна изява на МС поради близката ѝ асоциация с различните компоненти на МС, като абдоминално затлъстяване, артериалната хипертония, повишена кръвна захар на гладно или изявен ЗД2, завишени ТГ и ниските стойности на HDL . Много епидемиологични проучвания демонстрират връзката между НАСБ и МС, като често е налице асоциация с всички негови компоненти [50-52].

В едно проучване, което установява чернодробна стеатоза с ултрасонография, показва наличие на такава в 50% от пациентите с хиперлипидемия [53]. НАСБ също така се свързва и с артериалната хипертония, като редица срезови проучвания демонстрират, че почти 50% от пациентите с есенциална хипертония също имат и НАСБ [54, 55]. Пациентите с НАСБ, които притежават повече компоненти на МС се свързват с по-тежко чернодробно заболяване и повишена вероятност за прогресия до НАСХ и цироза. [56,57]. Мащабно лонгитудинално проспективно проучване с 15,791 участници от Китай са проследени за 6 годишен период, като се установяват 3913 нови случая с НАСБ, като рискът значително нараства при тези участници с МС [58]. Авторите установяват, че коефициентът на риска за възникване на НАСБ нараства с нарастването на компонентите на МС, достигащо 3,51 (95% OR 3.15-3.91), когато са налице 3 компонента в сравнение с индивидите, които нямат МС. Голямо проспективно кохортно проучване с над 22,000 корейски мъже показва, че НАСБ е независим рисков фактор за възникване на артериална хипертония и този риск нараства с тежестта на НАСБ [59]. Друго проспективно проучване изследва 1521 души, като ги стратифицира на базата на техния мастен чернодробен индекс (fatty liver index), сурогатен маркер за чернодробна стеатоза [60]. Авторите намират, че НАСБ диагностицирана с този скор е независим рисков фактор за поява на артериална хипертония. Съществуват доказателства, които показват, че НАСБ освен, че може да бъде проява на МС, може да бъде и необходима първа стъпка в неговото развитие. Установено е, че повечето лица с НАСБ имат и ИР, но също така е известно, че много от тях не притежават всички компоненти на МС [61]. Това може да означава, че чернодробната стеатоза представлява предпоставка за развитието на бъдещ МС и компоненти като нарушен глюкозен и липиден метаболизъм. Вече има достатъчно доказателства, че НАСБ е силен рисков фактор за развитието на МС и неговите различни компоненти. В голямо проспективно проучване с включени 17,920 пациента в Китай са проследени за шест годишен период [62]. В началото на проучването нито един от тях не е имал МС. Авторите определят НАСБ като независим рисков фактор за неговото развитие с коригирано съотношение на риска 1.55 (95% OR 1.39-1.72) . Подобни проучвания за НАСБ като независим рисков фактор за развитие на МС са провеждани в различни популации в това число Северна Америка [63], западна Австралия [64], Корея [65], Япония [66] и южна Индия [67].

## 2.3 Връзка на НАСБ със захарен диабет тип 2

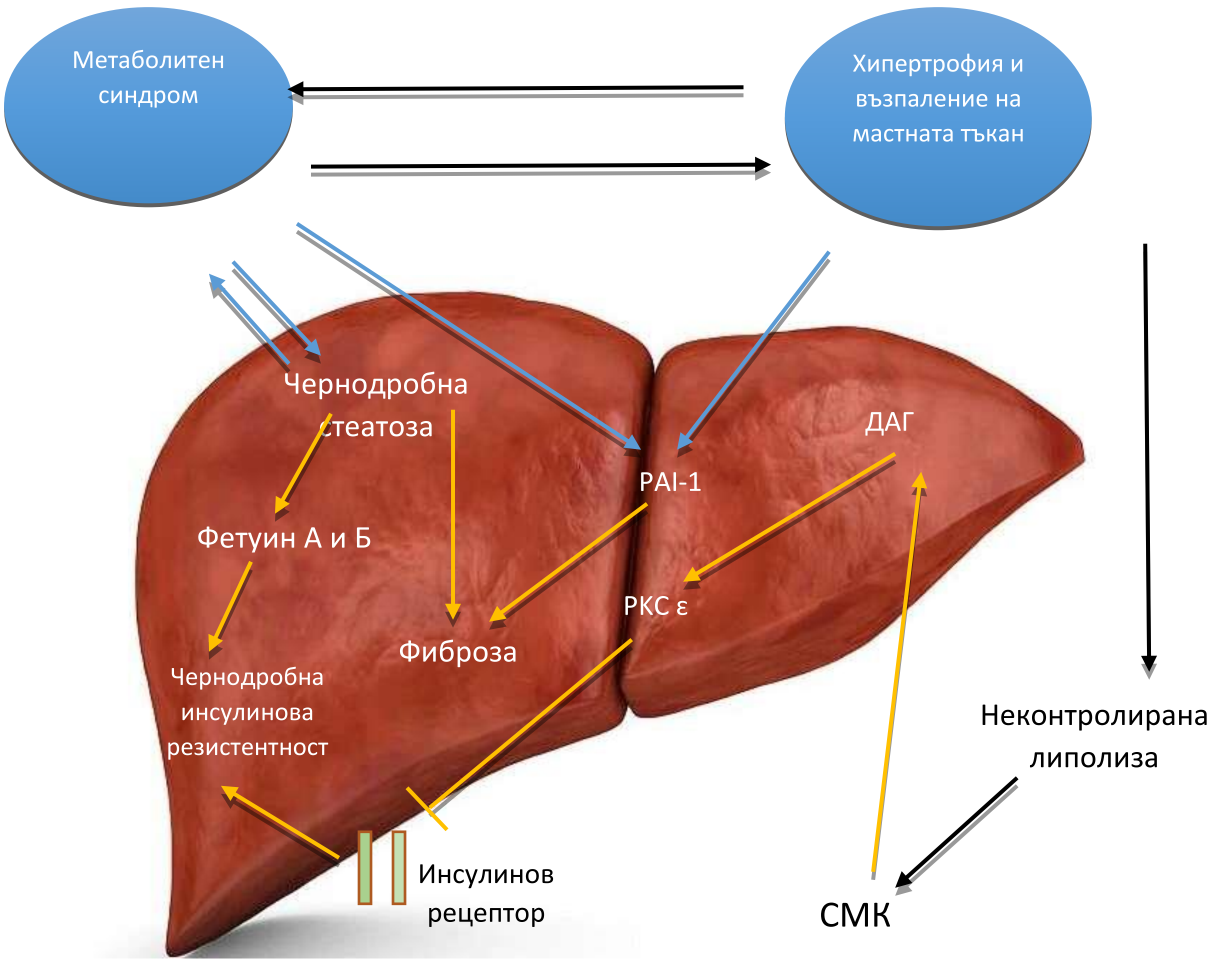
ЗД2 е социално значимо заболяване поради широкото си разпространение и тежките усложнения, които може да причини. Признат е за един от най-значимите здравни проблеми в световен мащаб. По данни на Международната Диабетна Федерация (IDF) през 2017 г. заболяването засяга 424.9 милиона души по света или 8.8% от възрастното население мужду 20 и 79 години, като прогнозите са броят им да достигне 628.6 милиона души през 2045 г. или 9.9% от населението [68]. Броят на хората с диагностициран захарен диабет в България към 2019 г. по данни на Българското Дружество по Ендокринология възлиза на 426 000 души, което представлява 7.9% от населението на възраст между 20 и 79 години (57% мъже и 43% жени). За изява на захарен диабет в българската популация значимо влияние оказват: артериалната хипертония (OR 4.585, 95% CI 3.002-7.003, $p<0.001$), увеличената обиколка на талията (OR 2.818, 95% CI 1.584-5.013, $p<0.01$), повишените нива на триглицериди (OR 1.584, 95% CI 1.125-2.229, $p=0.008$) и ниското ниво на HDL-холестерол (OR 1.394, 95% CI 0.997-1.947, $p=0.052$) [2].

В континиума на захарния диабет важно място заемат и предиабетните състояния – нарушена гликимия на гладно (НГГ) – плазмена глюкоза на гладно от 5.6 (6,1) mmol/l до 6.9 mmol/l и нарушен въглехидратен толеранс (НВТ) – плазмена глюкоза на 2-ри час в хода на ОГТТ между 7.8 mmol/l и 11.0 mmol/l. И двете нарушения (НГГ и НВТ) понастоящем се наричат „предиабет“. Те са рискови фактори за развитието както на ЗД2, така и на ССЗ в бъдеще. Смята се, че поне 318 милиони души в световен мащаб са с НВТ (IDF, 2015). В България около 222 433 души (3.7% от населението над 20 – годишна възраст) са с предиабетно състояние [3]. Половината от лицата с доказан предиабет при епидемиологичното проучване на Българското Дружество по Ендокринология през 2012 г. са развили ЗД2 при проследяването им 5 години по-късно, 31% от тях са останали с предиабет и 19% са показали нормален глюкозен толеранс. Необходимо е задължително провеждане на регулярен скрининг на популацията с предиабет, както и на лицата с кръвна захар на гладно ≥5.6 – 6.0 mmol/l [3].

В литературата се срещат множество проспективни проучвания, които показват, че НАСБ и сурогатните маркери с които тя се свързва са ключов рисков фактор и прекурсор за развитието на ЗД2. [69-77]. Ретроспективно проучване проведено в Корея с 13,218 участника установява, че развитието на чернодробна стеатоза се свързва с новооткрит ЗД2 [78]. Едно лонгитудинално кохортно проучване проследява 358 души (109 с НАСБ, 249 без НАСБ) за период от 11 години, като установява, че тези с НАСХ сигнификантно повече развиват ЗД2 през този проследяващ период, в сравнение с лицата без НАСБ. Същото се отнася и за пациентите, които развиват МС [79]. Подобно проучване в Корея, което проследява 12,853 трудово заети хора демонстрира, че съчетанието ИР, наднормено тегло/затлъстяване и чернодробна стеатоза значително увеличава риска от възникване на ЗД2 с коригирано съотношение на шансовете за тези с всичките три фактора и риск за отключване на ЗД2 за 5 –годишен проследяващ период 14.13 (95% OR 8.99-22.21) [80]. В допълнение на тези данни, метаанализ заключава, че наличието на НАСБ удвоява индивидуалния риск за развитие на ЗД2 на по-късен етап от живота [81]. От друга страна, съществуват неоспорими доказателства, ЗД2 може да влоши чернодробното заболяване. Ретроспективна студия със 103 души с НАСБ и хистологично изследване двукратно в интервал от три години, показват развитието на НАСБ, като подчертават, че пациентите със ЗД2 имат по-висок риск за прогресия на фиброзата в сравнение с не-диабетиците [82]. Също така са налице данни, които установяват, че ЗД2 се свързва с тежки чернодробни заболявания като цироза и ХЦК [83-86].

## 3. Патогенеза на НАСБ

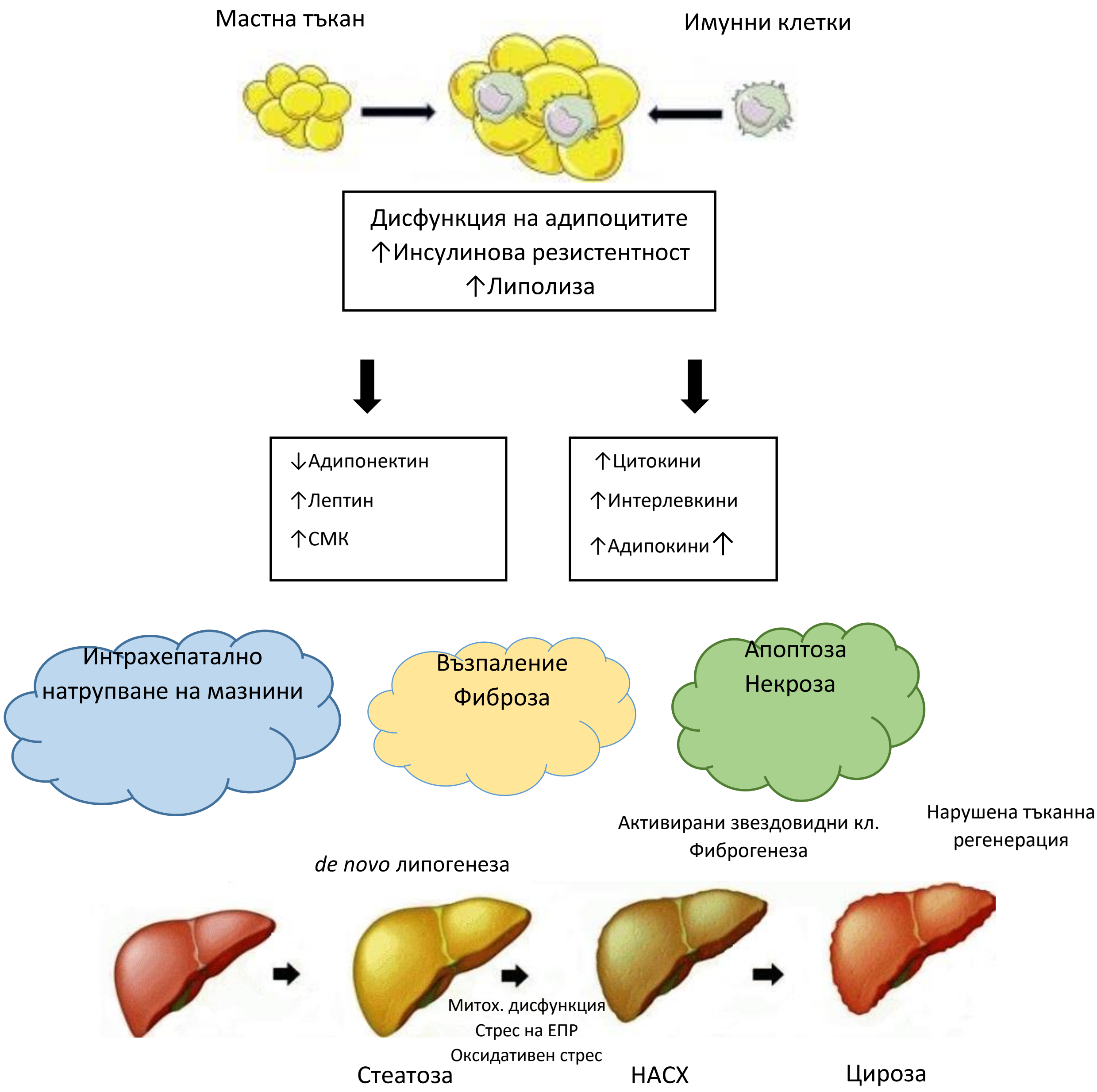
Инсулиновата резистентност заема централна роля както в патогенезата на МС, така и на НАСБ, като в подкрепа на тази теория има натрупани значителни доказателства [87]. (Фиг.1)




Фиг. 1 Двупосочната връзка между НАСБ и МС. (Модифицирано по Wainwright, 2016)

Day и сътр. описват връзката между НАСБ и ИР чрез двустъпковата хипотеза „two hit hypothesis" [88]. В нея „първият удар" е повишеното натрупване на триглицериди в резултат на инсулиновата резистентност и повишеното постъпване на свободни мастни киселини в черния дроб, което се последва от „втория удар", а именно оксидативния стрес на черния дроб в резултат на повишената липидна пероксидация. Тези два процеса неизбежно водят до хепатоцелуларно увреждане, възпаление и фиброза и потенциална прогресия на чернодробното увреждане. В последствие тази теория се доразви, като се възприе хипотезата за „multiple parallel hits”, при която в чернодробното възпаление се въвличат редица други фактори като цитокини и адипокини от екстрахепатални тъкани като чревния тракт и мастната тъкан. [89].

Еволюционно мастната тъкан има приспособителен характер. Тя е била необходима за складиране на енергия, когато е била в излишък и освобождавана за нуждите на организма, когато е имало дефицит на храна. С течение на времето обаче достъпността до храна се увеличава успоредно с намаляване на енергийния разход (физическата активност), което води до увеличаване на мастните депа и до поемането на тези функции от други органи, вкл. черния дроб. Когато капацитетът на мастната тъкан за съхранение на излишната енергия се понижи, както е при затлъстяване или състояния, при които няма мастна тъкан (липодистрофия), функцията на адипоцитите се поема от чернодробните клетки [90]. ( Фиг. 2)




Фиг. 2 Патогенеза на НАСБ при затлъстяване (Модифицирано по Polyzos, 2015)

Хепатоцитите складират излишните мазнини главно под формата на триглицериди, което води до развитие на чернодробна стеатоза. Наличието на излишък от циркулиращи СМК в резултат на ускорената липолиза и намаленото им отлагане в подкожната мастна тъкан може да доведе до ектопично натрупване на мазнини не само в черния дроб, но и в скелетната мускулатура с развитие на мултиорганна ИР [91]. Основният субстрат за чернодробните триглицериди се получава главно от хранителния прием (приблизително 15%), липолизата на мастната тъкан (приблизително 60%) и от *de novo* липогенеза в хепатоцитите от други източници, най-вече въглехидрати (приблизително 25%) [92]. Липотоксичността и глюкотоксичността са два процеса стартиращи в хепатоцитите в условията на повишени нива както на липидите, така и на въглехидратите и заемат централна роля не само при развитието на обикновената стеатоза, но и до по-късната й прогресия до НАСХ. Патофизиологичните механизми свързващи глюко- и липотоксичността с НАСБ включват увреждане на митохондриите, стрес на ендоплазматичния ретикулум (ЕПР), както и оксидативен стрес [93,94]. Митохондриите се приспособяват към натрупването на липиди в хепатоцитите, повишавайки нивата на β-окислението, но въпреки това увеличеното прехвърляне на субстрат към митохондриалната електронна транспортна верига води до повишаване на производството на реактивни кислородни радикали (ROS), които в крайна сметка потискат дихателната верига и интегритета на митохондриалната ДНК. По този начин ROS допринасят за токсичното увреждане на клетъчните органели, супресията на окислението на мастните киселини и увеличаване на липидната пероксидация [95]. В увреждането на хепатоцитите значение има и активирането на важни нуклеарни рецептори участващи в липидния метаболизъм като стерол регулаторен елемент-свързващ протеин 1 (SREBP-1), въглехидрат-отговорен елемент-свързващ протиен 1 (ChREBP-1), както и пероксизом-пролифератор активиращ рецептор γ (PPARγ) [96]. Активирането на PPARγ повишава поемането на СМК надвишавайки адаптивните пътища на чернодробния липиден експорт и катаболизъм, което е една своеобразна адипогенна трансформация на хепатоцитите [97]. От друга страна, освобождаването на СМК от дисфункционални и инсулин-резистентни адипоцити води до липотоксичност, индуцирана от ектопичното натрупване на токсични метаболити, в резултат на активиране на редица възпалителни пътища, клетъчна дисфункция и липоапоптоза. Липсата на хепатоцитен потенциал за освобождаване на излишните СМК води до липоапоптоза, което е съществена характеристика на НАСХ [98]. Мастната тъкан е източник на редица проинфламаторни цитокини като част от големия брой адипокини и когато затлъстяването и придружаващите рискови фактори не се коригират в стадия на обикновената стеатоза, започват интрахепатални възпалителни процеси, които отключени веднъж трудно могат да бъдат контролирани [99]. По време на този процес, чернодробните имунни клетки, включително Купферовите клетки, дендритните клетки, както и звездовидните клетки се активират, като в черния дроб настъпва постепенна инфилтрация от имунни клетки, включително неутрофили, моноцити, Т-лимфоцити и главно макрофаги [100]. В черният дроб имунните клетки освобождават цитокини, които акцелерират възпалителния процес, но също така допринасят за развитие на фиброза, процес, който обикновено се появява, когато е налице протрахирано възпаление [101]. По време на фиброгенезата, имунните клетки взаимодействат с клетките участващи в оздравителните процеси, в това число активирани ендотелни клетки, миофибробласти и прогениторни клетки на черния дроб. В хода на чернодробното увреждане тези активирани клетки водят до изразенна тъканна регенерация, която при нормални условия успява да замени хепатоцитите, подложени на клетъчна смърт или апоптоза. Когато този механизъм, обаче се протрахира, както е в условията на продължително затлъстяване, тези регенераторни процеси водят до развитието на фиброза. Чернодробна цироза и неоплазия са крайните резултати на тези процеси, в които звездовидните клетки са отговорни за чернодробната фиброгенеза в хода на хроничното чернодробно увреждане, като се активират и диференцират в миофибробласти [102]. Миофибробластите от своя страна, експресират актин и различни видове колаген, което води до тяхното отлагане и фиброза в извънклетъчния матрикс. По подобен начин, активираните звездовидни клетки индуцират гранулоцит-макрофаг-колония-стимулиращ фактор и интерлевкин-15 (IL-15), за да удължат оцеляването на неутрофилите, което може допълнително да допринесе за увреждане на черния дроб и развитие на фиброза [103].

Мастната тъкан е „най-голямата ендокринна жлеза" като затлъстяването засяга черния дроб и с участието на  редица адипокини и цитокини. Тук се включват IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18, C3 фракцията на комплемента, TNF-α, PAI-1, адипонектин, лептин, резистин, апелин, васпин, васфатин и др., както и някои хормони, получени от мастната тъкан, които могат да допринесат за развитие на стеатоза, НАСХ, цироза и канцерогенеза [104,105]. В нормални условия съществува баланс в нивото на адипокините, който значително се нарушава при развитие на затлъстяване [99].  В условията на затлъстяване този баланс на секретираните адипокини се измества към по-стеатогенен, възпалителен и фиброгенен профил. Имунните клетки (макрофаги, В-лимфоцити, Т-лимфоцити и неутрофили), инфилтриращи мастната тъкан, също произвеждат IL и класически цитокини (например, IL-1, IL-6,TNF -α), които взаимодействат с адипокините и задвижват механизма на тъканното увреждане и последващите регенераторни процеси. Възниква непрекъснат, динамичен антагонизъм между адипокини /цитокини с благоприятно действие (адипонектин, обестатин ) и такива с неблагоприятен ефект ( TNF-a, IL-6, хемерин, ретинол-свързващ протеин 4 (RBP4), резистин), които промотират стеатозата, възпалението и фиброзата [106].

Наличието на **дислипидемия** (хиперхолестеролемия, хипертриглицеридемия или и двете заедно) варира между 20%-80% от случаите с НАСБ [107]. Инсулиновата резистентност е свързана с увеличаване на потока на СМК към черния дроб, свързано с повишаване производството на ТГ, което от своя страна стимулира образуването и секрецията на VLDL в хепатоцитите. Много е важен въпросът как повишеното съдържание на СМК в хепатоцитите повлиява инсулиновия сигнал и индуцира ИР. В хепатоцитите дълговерижните мастни киселини се естерифицират с глицерол-3-фосфат (получен от гликолизата), като се образуват моноацилглицероли, диацилглицероли (ДАГ), триацилглицероли (ТАГ), церамиди и др. Тези междинни продукти от липидната обмяна са от изключително важно значение за ИР, намесвайки се в чернодробните инсулин-сигнални пътища, за активиране на чернодробното възпаление и за усилване на риска за прогресия на чернодробното заболяване [108,109]. Производството на ДАГ е пряко свързано с чернодробната ИР, като конверсията от ТАГ към ДАГ се медиира от мастната триглицерид липаза като вторичен посредник. ДАГ активира мембранната транслокация на протеин киназа Cε (PKCε), което инхибира инсулин- рецепторната киназа и намалява инсулиновия сигнал като активира серин фосфорилацията в инсулин-рецепторния субстрат -1 (IRS-1) [110].

Съществува голям интерес към изясняване значението на PKC-ε, която може да играе основна роля в този процес. В проучване на Samuel и сътр. се установява, че PKC-ε осъществява връзката между НАСБ и ИР [111]. Те изследват плъхове, които три дни са хранени с високо мазнинна диета, довела до развитието на сигнификантна стеатоза и чернодробна ИР определена с хиперинсулинемична еугликемична кламп техника, като се установява активиране именно на PKC-ε за разлика от другите форми на PKC. Тази връзка е изследвана и при хора в едно проучване с 37 обезни, не- диабетици подложени на бариатрична хирургия [112]. Авторите установяват, че чернодробното съдържание на ДАГ от чернодробната биопсия е най-силния предиктор на ИР и се определя на 64% от вариабилността на инсулиновата чувствителност. Съдържанието на чернодробния ДАГ силно корелира с активността на PKC-ε. Имайки предвид тези доказателства авторите считат, че натрупването на ДАГ в хепатоцитите активира PKC- ε, нейната транслокация през клетъчната мембрана и инхибирането на чернодробния инсулинов сигнал с резултат генериране и развитие на хепатоцелуларна ИР. Нарушеният инсулинов сигнал в черния дроб води до увеличаване на продукцията на ендогенна глюкоза и променен липопротеинов метаболизъм, което води до хипергликемия, ЗД2 и атерогенна дислипидемия [113]. Чернодробните липиди, които не са естерифицирани индуцират стрес на ЕПР, който води до активиране на c-Jun N-терминални кинази и

NF-κB, които представляват два основни регулатори на възпалителните пътища, инхибират фосфорилирането на IRS-1, засилват чернодробната ИР и повишават продукцията на чернодробни цитокини [114]. Синтезът на липиди като ДАГ е тясно свързан с възпалителни пътища, като ДАГ също може да допринесе за чернодробно производство на възпалителни цитокини като TNF-α, IL-6 и прокоагулантни фактори в това число фактор VIII и PAI-1. Редукцията на чернодробните мазнини и подобряване метаболизма на липидите в черния дроб може да промени риска от ЗД2 чрез специфичен за черния дроб ефект, а именно чрез понижение на секрецията на хепатокини и инфламаторни цитокини [115]. Секрецията на диабетогенни хепатокини, като RBP4, фетуин A, фибробластен растежен фактор (FGF)-21, както и инфламаторни биомаркери като CRP, TNF-α, IL-6 могат директно да повлияват риска от ЗД2 чрез неблагоприятното въздействие върху чернодробната глюконеогенеза, синтеза на гликоген и инсулиновата сигнализация [116,117].

От друга страна нивата на **адипонектина** са понижени при пациенти с НАСБ, независимо от повишената липолиза и повишените нива на СМК. Адипонектинът основно се синтезира в мастната тъкан, като участва активно в глюкозния и липидния метаболизъм. Той модулира функцията на инсулиновия рецептор, както и метаболизма на СМК в хепатоцитите, като циркулиращите му нива корелират обратно с ИР, ЗД2 и дислипидемията [118]. Адипонектинът се счита за биомаркер свързан с прогресията на НАСБ до НАСХ, нещо повече, серумните му нива са значително по-ниски при пациенти с НАСБ в сравнение с пациенти с други хронични чернодробни заболявания [119]. Хипоадипонектинемията при НАСБ е част от метаболитните нарушения свързани с МС, с установена сигнификантна връзка между понижените нива на адипонектина и мастното съдържание в черния дроб. Антиинфламаторното действие на адипонектина е една от основните му функции, което е свързано с влиянието му върху продукцията на проинфламаторни цитокини като TNF-α и IL-6. Неговият антистеатозен ефект се дължи основно на благоприятното му влияние върху липидния и въглехидратния метаболизъм, в това число на повишеното окисление на СМК, понижената глюконеогенеза и инфлукса на СМК, както и понижение на *de novo* липогенезата в черния дроб. По този начин адипонектинът протектира хепатоцитите от апоптоза, което е от ключово значение за НАСБ. Адипонектинът активира AMPK, както и PPAR-α, което стимулира окислението на МК в черния дроб и мускулите [120].

**Лептинът** е пептиден хормон, експресиран главно от мастната тъкан, но също така и от скелетната мускулатура, стомаха, плацентата и яйчниците. Неговата основна роля е свързана с регулиране на енергийната хомеостаза и метаболизма, както и репродуктивната и невроендокринната функция [121]. Секрецията на лептин е пропорционална на мастната тъкан, като една от основните му функции е свързана с антиобезни сигнали и контрол на апетита чрез активиране през аркуатното ядро на определени отдели от хипоталамуса. Той намалява приема на храна и повишава енергийния разход като регулира симпатикусовия тонус в условията на енергиен излишък, индуцирайки редица анорексигенни фактори [122]. Серумните нива на лептина са значително увеличени при обезни пациенти с НАСБ, което е свързано с резистентност към неговото действие. Лептинът допринася за развитието на ИР чрез дефосфорилиране на IRS-1 и намаляване на индуцираната от глюконеогенезата чернодробна стеатоза. Нещо повече, лептинът има и проинфламаторно действие, като е способен да повиши секрецията на TNF-α, IL-6 и IL-12 с последващо усилване на възпалението и развитие на чернодробна фиброза [123]. Съотношението лептин/адипонектин е предложено като потенциален сурогатен биомаркер, много по-информативен в сравнение със самостоятелно им измерване в диагностиката на ССЗ и за появата на МС [124].

**TNF-α** е основен цитокин, който се характеризира с метаболитно, инфламаторно, пролиферативно и некротично действие с висока експресия в мастната тъкан и черния дроб, което го прави основен участник в развитието на НАСБ [125]. TNF-α се произвежда от макрофагите в мастната тъкан, хепатоцитите и Купферовите клетки като медиира ИР чрез влияние върху IRS-1 и инсулин-рецепторната киназа. Тези процеси са свързани с нарушение на инсулиновия сигнал и повишаване на периферната липолиза, които водят до каскада от патологични реакции като възпаление, некроза, апоптоза и фиброза.

**IL-6** е проинфламаторен цитокин, секретиран от адипоцитите, имунните и ендотелните клетки. Циркулиращите нива на IL-6 са повишени при затлъстяване и ИР, като се счита за предиктивен фактор за развитие на ЗД2 [126]. Нивата му са повишени при пациенти с НАСБ, като се асоциира с тежестта на хистологичните промени. IL-6 се определя като полезен, неинвазивен биомаркер за разграничаване на НАСХ от обикновената стеатоза [127].

**Чревният микробиот** е интегрирана екосистема, която съдържа над $10^{13}$-$10^{14}$ микробни клетки (10 пъти повече от клетките в човешкото тяло), характерни за четири главни типа бактерии – *Firmicutes* (65%), *Bacteroidetes* (16%), *Proteobacteria* (9%) и *Actinobacteria* (5%). Общият геном на чревния микробиот, наречен микробиом съдържа над 100 пъти повече гени в сравнение с човешкия геном [128]. През последните години все по-голямо внимание се обръща на влиянието на чревно-чернодробната ос, като част от патогенетичните компоненти, които участват в затлъстяването, ИР и други метаболитни рискови фактори. В тази връзка се подчертава и значението на повишената консумация на обезогенни храни и по-специално на фруктоза и мазнини, които могат да доведат до дисбаланс в чревния микробиот и да нарушат чревната бариера с развитие на метаболитна ендотоксинемия и субклинично възпаление [129]. Чревният микробиот участва в развитието и прогресията на НАСБ чрез няколко механизма включващи повишаване на чревния пермеабилитет и развитие на ендотоксинемия, повишено енергийно съдържание и покачване на теглото, производство на ендогенен етанол, понижаване на производство на жлъчни киселини с нарушения в храносмилането и др. [130].

При затлъстяване настъпват редица промени в разпределението на чревния микробиот в сравнение с индивидите с нормално телесно тегло. Обезогенната диета променя съотношението между Грам-позитивните и Грам-негативните бактерии, в резултат на което се повишава синтеза на липополизахаридите, с висока чернодробна експозиция на ендотоксини през порталната вена с последващо чернодробно възпаление [131].

В рамките на този метаболитен контекст, затлъстелите пациенти имат повишена способност да получават повече енергия от храната. Това става възможно чрез ензимите на бактериите, които могат да извличат калориите от иначе несмилаеми полизахариди, приети с храната. Чревните бактерии потискат синтезата и секрецията на тънкочревния адипоцитен фактор, което води до активиране на липопротеинлипазата и повишавано натрупване на триглицериди в хепатоцитите [132].

**Витамин Д** е мастно разтворим витамин, който съществува под няколко форми, като две от тях ергокалциферол и холекалциферол са с най-висока експресия [133]. Различните форми на витамин Д медиират своите сигнали чрез витамин Д рецептор, който се експресира в хепатицитите. Свързването между витамин Д и неговия рецептор (VDR) води до регулиране на над 200 гена участващи в липидния и глюкозния метаболизъм [133, 134]. Проучванията показват**,** че дефицитът на витамин Д и по-конкретно на холекалциферол силно се свързва с МС и може да повиши риска за кардиометаболитни нарушения като ЗД2, артериална хипертония и ССЗ, както и да повиши смъртността [135]. От друга страна е установено, че нива на холекалциферол над 25 ng/ml се свързват с 43% по-нисък риск от ЗД2 в сравнение с нива под 14 ng/ml и, че лечението с витамин Д може да подобри ИР [136]. Установено е също така, че нивата на холекалциферол са по-ниски при пациенти с НАСБ в сравнение със слаби контроли, както и че това е свързано с по-тежки хистологични промени [137]. Експерименталните проучвания представят различни механизми по които витамин Д повлиява развитието на НАСБ. Установено е, че експресията на VDR е в обратна връзка с хистологичния спектър на НАСБ, независимо от останалите метаболитни компоненти, вкл. ИТМ [138]. Витамин Д притежава антипролиферативно и антифиброзно действие и има важна роля в регулацията на екстрацелуларния матрикс в черния дроб, осъществена чрез VDR сигнални пътища, които могат да намалят експресията на редица фиброгенни гени като TNF-α, TGF-β, както и да потиснат пролиферацията на звездовидните клетки [139]. От друга страна ролята на витамин Д в модулацията на адипокините е обект на интензивни проучвания, като се установява директна връзка между холекалциферола и серумните нива на адипонектина, независимо от ИТМ [140].

# 4. Нови биомаркери свързани с метаболитните нарушения и прогресията на НАСБ

## 4.1 Хепатокини, адипокини и екстрацелуларни матриксни протеини асоциирани с НАСБ

През последните години особено внимание се обръща на т.нар. органокини, предимно протеини с паракринна и/или ендокринна активност участващи в патогенезата както на МС, ЗД2, ССЗ, така и при НАСБ. Тук се включват адипокини, голяма част от които синтезирани предимно от мастната тъкан, миокини, продукти главно от скелетната мускулатура и хепатокини, произвеждани основно от черния дроб. За повечето от тях тази класификация е условна, тъй като могат да имат повече от един източник.

### 4.1.1. Ретинол свързващ протеин 4 (RBP4)

RBP4 (Retinol-binding protein 4) е специфичен трансферен протеин, секретиран от хепатоцитите и адипоцитите за свързване и транспорт на витамин А (ретинол) от кръвта в клетките [141]. Той се секретира в плазмата, свързан с ретинол и транстиретин (TTR) като третичен ретинол-RBP4-TTR комплекс, като най-силно е експресиран в черния дроб, последван от мастна тъкан [142]. Съществуват противоречиви данни относно участието на този адипокин в патогенезата на ИР, предиабетните състояние, както и ЗД2 [143-146]. Повишени нива на RBP4 се установяват при много състояния сварзани с ИР като затлъстяване, ЗД2, НВТ, МС и НАСБ, както и при субклинична атеросклероза и ССЗ [27,147]. Повишените нива на RBP4 повлияват директно експресията на фосфоенолпируват карбоксикиназа (PCK2), като увеличават производството на глюкоза и намаляват действието на инсулина в хепатоцитите. RBP4 е описан като връзка между нарушеното поемане на глюкоза в адипоцитите и системната инсулинова чувствителност, като някои автори го наричат диабетогенен хепатокин [148-151]. Освен това RBP4 може да предизвика инсулинова резистентност, като допринася за развитието на нискостепенно възпаление в мастната тъкан чрез активиране на проинфламаторни цитокини в макрофагите [146]. От друга страна, RBP4 стимулира Sterol regulatory element-binding protein – 1 (SREBP-1) и увеличава липогенезата чрез пероксизомен пролифератор-активиран рецептор-γ коактиватор 1β-зависим път [152]. Някои проучвания показват, че повишените нива на RBP4 са рисков фактор за развитието както на НАСБ, така също и на коронарната съдова болест и може да се разглеждат като неинвазивен биомаркер в диагностиката на НАСБ и на острия коронарен синдром [149,151,153]. RBP4 може да инхибира инсулиновата активност, да намали нивата на NO в ендотелните клетки и да повиши ендотелната дисфункция [149].

Няма достатъчно данни за връзката му с ранните етапи от нарушената глюкозна регулация при НАСБ.

### 4.1.2. Хемерин

**Хемерин**, известен още като retinoic acid receptor responder protein 2 (RARRES2) е друг сравнително скоро открит органокин, който силно се експресира в мастната тъкан, черния дроб и белите дробове. Секретира се като неактивен прохемерин, като след активиране се свързва със специфичен хемокин-подобен рецептор 1 (CMKLR1) [154,155]. CMKLR1 е силно разпространен в черния дроб като се експресира от хепатоцитите, звездовидните чернодробни клетки, Купферовите клетки и клетки на жлъчния канал [156]. Хемеринът участва в регулирането на възпалението, глюкозния и липидния метаболизъм, като стимулира липолизата чрез директно активиране на хормон-чувствителната липаза в адипоцитите и е доказано, че има директна положителна корелация с индексите на затлъстяване [157,158].
В някои проучвания се установява, че хемеринът е свързан с ИТМ, нивата на ТГ и ОХ, артериалното налягане и ИР [159-161]. Установено е също така сигнификантно повишение на хемерина при пациенти с НАСБ и особено при НАСХ в сравнение със здрави лица [162]. Други автори го определят като вероятен маркер за МС във връзка с повишената му експресия при затлъстяване [163]. Някои мета-анализи предполагат, че повишените нива на хемерина при пациенти със затлъстяване или МС могат да се свържат с дисбаланс в липидния и глюкозния метаболизъм, както и в развитието на ИР [164]. Muruganandan и сътр. изследват връзката между експресията на хемерина и пероксизомен пролифератор-активиран рецептор γ (PPARγ), ядрен рецептор, който е важен регулатор на адипогенезата и експресията на адипокини, като Розиглитазон, който е PPARγ агонист, намалява селективно експресията му в зрелите адипоцити, *in vitro u in vivo* [165].

Съществуват противоречиви и не достатъчни данни за връзката на хемерина с въглехидратните нарушения и НАСБ.

### 4.1.3. Лумикан

**Лумиканът** е 38-kDA екстрацелуларен матриксен протеогликан, сравнително скоро обсъждан като показател за чернодробна фиброза. Той принадлежи към малка, богата на левцин фамилия от кератин сулфат протеогликани, които участват в структурата на редица тъкани [166]. Лумиканът участва в колагенната фибриногенеза в различни екстрахепатални структури, като значението му при чернодробните заболявания не е напълно изяснено. Чернодробната фиброза е краен стадии на много хронични чернодробни заболявания и се характеризира с повишено натрупване на колаген в екстрацелуларния матрикс. Тя е резултат на множество молекулярни събития с първоначално клетъчно увреждане, включващо различни типове клетки, сигнални молекули, разнообразни патогенетични пътища, които продължават да бъдат разкривани и проучвани [167]. Неговите нива са повишени както при пациенти със затлъстяване и нормална чернодробна хистология, така и при начална стеатоза като най-изявена е експресията му при НАСХ [168]. Различната експресия на лумикан през различните стадии на НАСБ дава възможност за ранна диагноза още в префибротичния стадии на НАСХ [169]. Последни клинични проучвания показват различни функции на лумикан, свързани с регулиране на ангиогенезата, клетъчната пролиферация, клетъчната миграция, TLR4- сигнализация и др. [170-172].

Не е изяснена ролята на лумикана в патогенезата на НАСБ и свързаните с нея въглехидратни и съдови нарушения.

### 4.1.4. Пентраксин 3 (PTX3)

Пентраксинът е семейство протеини, разделени на два къси и дълги класа, на базата на дължината на тяхната структура. С-реактивният протеин (CRP) и серумният амилоид са също част от късия клас на тази фамилия. Пентраксин 3 е наскоро идентифициран остро фазов реактант, който наподобява CRP както в структурата, така и във функцията [173]. Плазменият PTX3 е дълъг протеин от същата фамилия, който се произвежда от много видове клетки, като макрофаги, дендритни клетки, неутрофили, мастни клетки, фибробласти и съдови ендотелни клетки [174,175]. Установени са завишени серумни нива на PTX3 при редица остри и хронични заболявания, в това число васкулити, остър миокарден инфаркт, нестабилна ангина пекторис, сепсис, псориазис и сърдечна недостатъчност. [176-182]. Karakas и сътр. установяват значително по-високи нива на PTX3 при пациенти с МС , като серумните му нива се повишават с увеличаване на тежестта на МС [183]. Yoneda и сътр. за първи път съобщават, че плазмените нива на PTX3 са значително по-високо при пациенти с НАСХ, отколкото при тези с обикновена стеатоза или здрави контроли [184]. Серумните концентрации на PTX3 са значително по-високи при пациенти в напредналите стадии на НАСБ, като по-високите нива корелират с тежестта на чернодробна фиброза. Това вероятно би могло да доведе до използване на PTX3 като маркар за диагноза на тежестта на чернодробна фиброза, както и за диференциация между НАСХ и обикновената стеатоза [185].

Необходими са бъдещи проучвания за връзката между PTX3, НАСБ и свързаните метаболитни и сърдечно съдови рискови фактори.

### 4.1.5. WISP2

WISP2 (Wnt1-inducible signaling pathway protein-2, известен още като CCN5 –Connective tissue growth factor 5) е нов адипокин, най-силно експресиран в подкожната мастната тъкан, както и в недиференцирани мезенхимни клетки. Той е член на фамилия екстрацелуларни матрикс-свързани протеини и представлява таргетен ген за WNT-сигналния път. CCN протеините участват в митозата, адхезията, апоптозата, производство на екстрацелуларния матрикс, в спирането на растежа и миграция на множество клетъчни типове [186].

Все повече нараства важността и интересът към взаимодействията в клетъчния матрикс както в нормалните биологични процеси, така и в патогенезата на редица заболявания. Семейството CCN и техните сродни протеини привличат все по-голямо внимание за широк спектър от биологични събития, които са в основата на развитието и физиологичните функции на всички органи в организма.

WISP2 е мултитъканен и мултифункционален протеин с изразени клетъчно-специфични ефекти. В мастната тъкан се експресира главно в недиференцирани мезенхимни прекурсорни клетки и преадипоцити. WISP2 е също така важен регулатор на растежа и диференциацията на адипоцитните прекурсори [187]. Разрастването на мастната тъкан може да бъде индуцирано от хиперплазия с увеличаване на прекурсорните клетки от адипогенната линия или чрез хипертрофия на вече съществуващи адипоцити. Хипертрофичното затлъстяване характерно за висцералния тип, води до дисфункция на мастната тъкан, локално и системно възпаление, инсулинова резистентност и тъканна фиброза, докато хиперпластичното затлъстяване, присъщо за глутео-феморалния тип играе протективна роля [188-190].

Положителните ефекти на секретирания WISP2 върху хиперплазията на адипоцитите и растежа на мезенхималната тъкан, както и на свързаното с това повишение на нивата на адипонектина и подобрена инсулинова чувствителност правят WISP2 нова и привлекателна цел за предотвратяване на свързаните с наднорменото тегло метаболитни нарушения, включително ИР и ЗД2 [187].
От друга страна WISP2 е силно експресиран в някои ракови клетки, където е добре установен туморен супресор, антагонизиращ ефекта на TGFβ и неговата индукция на епително-мезенхимна клетъчна трансформация, което го прави надежден кандидат за терапевтични цели [191]. CCN протеините намаляват активността на екстрацелуларния матрикс и свързаните с тях растежни фактори като TGFβ, BMP4, IGFs и VEGF.

Установено е, че свръхекспресията на WISP2 в сърцето на експериментални модели мишки се свързва с антифиброзно действие, намаляващо образуването на миофибробластите, индуцирано от TGFβ и предотвратяващо развитието на фиброзна сърдечна недостатъчност [192].

Връзката на WISP2 с предиабетните състояние, както и с НАСБ и нейната прогресия не е добре проучена, като се предполага, че при тези пациенти е налице понижена експресия, което е свързано с водещото хепертрофично затлъстяване и неговите метаболитни последици.

### 4.1.6. Фетуин А

Фетуин-А, известен още като alfa-2-Heremans-Schmid glycoprotein (64 kDa) се произвежда основно от черния дроб. При хората фетуин А генът е локализиран в хромозома 3q27, която е идентифицирана като суспектен локус за ЗД2 и МС [193]. Този мултипотентен хепатокин участва в регулацията на костния метаболизъм, миграцията на кератиноцитите и контрола на протеолитичната активност. Също така се счита за биомаркер на невродегенеративни заболявания, както и за индуктор на ИР, сърдечно-съдов риск, ендотелна дисфункция и субклинична атеросклероза [194]. Установена е връзка между Фетуин-А и повишен риск от миокарден инфаркт и исхемичен инсулт, независимо от стандартните рискови фактори, като все още не е решено дали фетуин-А може да се приеме за потенциален маркер за сърдечно-съдов риск при пациенти с НАСБ [195]. Скорошни студии показват позитивна корелация между фетуин-А и дебелината на интима медиа при възрастни пациенти с НАСБ, което не се потвърждава от други автори [196, 197]. Предполага се, че фетуин-А има участие във връзката между затлъстяването, ИР и НАСБ. [198, 199]. Установено е, че фетуин-А е инхибитор на инсулин- рецепторната тирозинкиназа в черния дроб и скелетната мускулатура, водеща до потискане на автофосфорилацията на тирозинкиназата в инсулиновия рецептор и IRS-1, което води до инсулинова резистентност [194]. Установено е също така, че при мишки лишени от *Absg*, генът, който кодира фетуина А, се подобрява инсулиновия сигнал [200]. Тези открития показват, че фетуин-А може да играе критична роля в регулацията на инсулиновата чувствителност. Повишената концентрация на наситени мастни киселини чрез NF-кВ, както и повишените нива на кръвна захар чрез ERK 1 и 2 активирани сигнални пътища индуцират чернодробната синтеза на този хепатокин [201]. Хепатоцитите секретират фетуин-А в кръвта, който се свързва с инсулиновия рецептор в тъканите, инхибира инсулинивия сигнал и индуцира инсулинова резистентност. Също така повлиява наситените мастни киселини, които чрез TLR-4 рецептора водят до активиране на инфламаторни сигнални пътища и ИР [201]. Повишените плазмени нива на фетуин А при пациенти с НАСБ показва потенциалната му връзка с ИР и чернодробната стеатоза, като се счита за ранен маркер и предиктор на ЗД2 [202].

Различни резултати са наблюдавани по отношение на фетуина-А, свързани с тежестта на чернодробната фиброза. Yilmaz et al. демонстрират положителна корелация на фетуин А с фиброзния скор при пациенти с НАСБ, докато Sato et al. установяват отрицателна корелация с НАСБ фиброзния скор, за разлика от други автори, които не намират връзка между фетуин А и резултатите от морфологичното изследване на черния дроб [194, 197, 203-205]. Някои автори демонстрират повишена експресия на фетуин А мРНК при пациенти с НАСХ в сравнение с обикновена стеатоза [205]. Редукцията на тегло при пациенти с НАСБ и затлъстяване води до намаляване както на чернодробните мазнини, така и на нивата на фетуин А [206]. Нещо повече, установено е, че дори за кратък период от 7 дни продължителни физически упражнения водят до значително понижаване нивата на фетуин А, независимо от липсата на ефект по отношение на телесното тегло и съдържанието на ТГ в хепатоцитите оценено с протонен МРТ [207].

Необходими са бъдещи експериментални и клинични проучвания, които да потвърдят тези хипотези, както и ролята и мястото на фетуин А в МС, сърдечно-съдовите заболявания и НАСБ.

### 4.1.7. Фибробластен растежен фактор 21 (FGF-21)

FGF-21 е пептид произвеждан главно от черния дроб, като малки количества се отделят и от панкреаса, тестисите, дуоденума и мастната тъкан. Генът за FGF-2 е локализиран в хромозома 19 [208, 209]. Представлява хепатокин, който регулира липидния и въглехидратния метаболизъм и редуцира чернодробното натрупване на липиди по инсулин- независим начин [210]. Участва в много елементи от патогенезата на НАСБ като оксидативен стрес, стрес на ЕПР, митохондриална дисфункция и ниско-степенно хронично възпаление [211,212]. Понастоящем FGF-21 се счита за нов метаболитен регулатор, който участва в патогенезата на НАСБ. Множество проучвания показват сигнификантно по-високи серумни концентрации на FGF-21 при пациенти с НАСБ в сравнение с контроли [213-215]. Нещо повече, някои от тези студии установяват, че повишените серумни нива на FGF-21 могат да се считат за независим предиктор на НАСБ [216]. В студии с животински модели се установява връзка между FGF-21 и тежестта на чернодробна фиброза [217]. Счита се, че FGF-21 може да бъде използван за не инвазивен биомаркер в диференцирането на обикновената стеатоза и неалкохолния стеатохепатит [218]. Съществуват предположения, че повишената чернодробна експресия на FGF-21 е в резултат на FGF-21 резистентност, която стои в основата на НАСБ/НАСХ. Повишените нива на FGF-21 може би представляват потенциален протективен фактор срещу липидните и въглехидратните метаболитни нарушения [219]. В експериментални студии с диета-индуцирани обезни мишки, приложението на FGF-21 води до намаляване на чернодробната стеатоза, редуцира серумните и чернодробните нива на триглицеридите, подобрява инсулиновата чувствителност и намалява кръвната захар на гладно [220,221].

FGF-21 представлява не само нов метаболитен регулатор, който участва в патогенезата на НАСБ, но към него се отправят надежди и за лечението на НАСБ/НАСХ.

Повишените нива на FGF-21 могат да бъдат потенциално протективен фактор срещу липидните и въглехидратните нарушения [222, 223]. При диета - индуцирани затлъстели мишки, прилагането на FGF-21 причинява намаляване на чернодробната стеатоза и понижение на нивата на триглицеридите в серума и черния дроб чрез инхибиране на SREBP-1, ключов фактор в липогенеза [224]. Подкожното приложение на краткодействащ FGF-21 аналог (LY2405319) подобрява инсулиновата чувствителност и липидния профил при ob/ob и диета-индуцирани обезни мишки [225]. Клинично проучване с FGF-21 аналог LY2405319 при пациенти със затлъстяване и ЗД2, установява сигнификантно подобрение на дислипидемията, благоприятен ефект върху теглото, инсулина на гладно и нивата на адипонектина [225]. Необходими са бъдещи проучвания за потвърждаване на ефикасносността на една такава терапия при пациенти с НАСБ.

### 4.1.8. Ангиопоетин- свързан растежен фактор (AGF)

Ангиопоетин-свързан растежен фактор (AGF), известен още като ангиопоетин-свързан протеин 6 се кодира от гена *Angptl6* и се секретира в кръвообращението след образуването му в черния дроб. Идентифициран е от Oike и сътр., които установяват, че мишки с недостиг на AGF развиват затлъстяване, инсулинова резистентност и липидно натрупване в черния дроб и скелетната мускулатура [226]. Авторите предполагат, че този хепатокин може да има важна функция в метаболизма на липидите и въглехидратите и може да се разглежда като протеин, който предпазва от затлъстяване и инсулинова резистентност. От друга страна, Ebert и сътр. установяват, че серумната концентрация на AGF са значително увеличени при диабетици в сравнение с пациенти без диабет [227]. AGF положително корелира с маркерите за инсулинова резистентност и отрицателно с HDL-холестерола [227]. Namkung и сътр. установяват повишени нива на AGF при пациенти с МС , както и че МС може да бъде предиктор за серумното ниво на този адипокин. Същите автори предполагат, че функцията на AGF може да бъде различна при хората и при животните. Пациентите с МС или ЗД2 могат да бъдат с намалена чувствителност към AGF [ 228]. Една от теориите за механизма чрез който AGF оказва влияние върху метаболизма на глюкозата е, че AGF потиска производството на глюкоза в хепатоцитите по зависим от концентрацията й начин чрез понижаване на експресията на глюкозо-6 фосфатазата. Освен това in vitro анализите показват намалена чернодробна глюконеогенеза след третиране с AGF. Kitazawa и сътр. предполагат, че AGF може да се счита за нова

терапевтична цел на ЗД2, затлъстяването, МС, както и на НАСБ [229]. До момента няма публикации за ролята на AGF в НАСБ, но гореспоменатите данни предполагат, че този хепатокин може потенциално да бъде включен в патогенезата на тази болест.
Необходими са бъдещи проучвания за уточняване на ефективността, метаболитните действия и приложението на AGF.

#### 4.1.9. Секс-хормон свързващ глобулин (SHBG)

SHBG се произвежда главно от черния дроб [230]. Основната функция на този хепатокин е транспорта на половите хормони, като циркулиращите му нива се свързват с глюкозния метаболизъм, затлъстяването, както и с останалите компоненти на МС [231, 232]. При постменопаузалните жени с хистологично доказана НАСБ са установени понижени нива на SHBG в сравнение с контролна група, като серумните му концентрации се свързват с НАСБ независимо от възрастта, ИТМ и обиколката на талията [233]. Връзка между понижените нива на този хепатокин с НАСБ също е демонстрирана и при пациенти със ЗД2 [234]. Също така е установено, че серумните нива на SHBG намаляват с увеличаване на интрахепаталното съдържание на мазнини, както и обратно, промяната в начина на живот и редукцията на тегло водят до повишаване на SHBG, което е пряко свързано с подобряване на чернодробната стеатозата [235]. Аналогична връзка между SHBG и интрахепаталното съдържание на мазнини е потвърдена при различни групи пациенти, където стеатозата на черния дроб се оценява с помощта на ултразвук [236, 237], МРТ [238] или КТ [239]. Установена е също така връзка между нивата на SHBG и адипонектина. Simo et al. демонстрират, че адипонектина повишава синтеза и секрецията на SHBG чрез активиране на AMPK, което води до намаляване на съдържанието на мазниин в черния дроб [240]. Peter et al. демонстрират, че нивата на SHBG са в тясна връзка с инсулиновата чувствителност, независимо от нивата на адипонектина и фетуин- А [241].
Не намерихме публикации за SHBG при пациенти с НАСБ с или без предиабет.

## 4.2. Генетични полиморфизми при НАСБ

Все повече доказателства сочат, че НАСБ се развива в резултат на сложен процес, който включва генетичната предиспозиция и факторите на околната среда. Установено е, че стеатозата и фиброзата потенциално споделят едни и същи предразполагащи гени, но също така, че тези промени имат значителен генетичен ефект на метаболитни рискови фактори, което е наистина забележително откритие [242].

През последните години интересът е фокусиран върху някои специфични гени, свързани с НАСБ и нейната прогресия. Най-голяма връзка се установява между НАСБ и два генетични полиморфизма, а именно PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K.

### 4.2.1. PNPLA3

Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) е ген, който кодира специфичен протеин наречен адипонутрин. Точната роля на този адипонутрин не е напълно изяснена, но е установено, че представлява мембранно-свързан протеин експресиран в чернодробната и мастната тъкан, притежаващ липогенетична и липолитична активност [243]. Той е локализиран в липидните капки и може да участва в хидролизата на триглицеридите. През 2008 година за първи път излезе съобщение, че определен алел в PNPLA3 (I148M или rs738409) притежава силна връзка с чернодробната стеатоза и чернодробното възпаление, като хомозиготните носители притежават два пъти по-голямо натрупване на мазнини в черния дроб в сравнение с носителите на дивия ген [244]. Dallas Heart Study демонстрира, че най-голяма честота на I148M се среща при латиноамериканците, сред които НАСБ е с най-голям процент като цяло и че наличието или отсъствието на PNPLA3 I148M вариант заедно с друг (453I) представлява 72% от изследваните етнически различия при чернодробната стеатоза [245,246]. Последващи проучвания установяват, че този генетичен полиморфизам се среща също така в не малък процент при индивиди и от другите раси, като честота му достига до 21%-28% в европейската популация [247- 251]. Интересен е фактът, че връзка между PNPLA3 I148M и НАСБ може да бъде по-значима при жените, отколкото при мъжете, което е подчертано от Speliotes и съавтори в специфичен за пола анализ, извършен върху група с хистологично установен НАСХ [252].

PNPLA3 се намира на хромозома 22, която принадлежи към семейството на пататин-подобни фосфолипази (известен също като адипонутрин или калциево-независима фосфолипаза А2-епсилон). PNPLA3 кодира трансмембранна полипептидна верига, проявяваща триглицеридна хидролазна активност, която е силно изразена върху ендоплазматичния ретикулум и липидните мембрани на хепатоцитите и мастните клетки [253]. Доказано е, че PNPLA3 е важен регулатор за триглицеридите, който може да действа както като фосфолипаза, така и като ацил-трансферен ензим. Установено е, че експресията на PNPLA3 при хора може да бъде повлияна от редица фактори, включително диета, затлъстяване, нивата на инсулина и глюкозата, както и от генни мутации [254]. Най-често изследваният вариант на PNPLA3 е rs738409, променящ див тип цитозин до гуанин при nt444 (c.444 C> G), който от своя страна променя изолевцин до метионин при остатък 148 (p.1488M) в експресирания протеин. Тази мутация ограничава свързването на субстрата с каталитичния край на ензима и намалява активността на триглицерид хидролазата. В допълнение, вариантът на PNPLA3 е свързан със загуба на ретинил-палмитат липазната активност в адипоцитите [255].

Това води до промени в липидния катаболизъм, ремоделиране на липидните капки и VLDL секрециата в хепатоцитите [256, 257]. Проучванията показват, че носителите на мутантния алел G са по-склонни да развият НАСБ, което е свързано с нарушение в хидролизата на триглицериди в чернодробните клетки, водещо до натрупването им в черния дроб, нарушена секреция на VLDL и появата на стеатоза [258]. Редица студии показват, че мутацията PNPLA3 I148 M на мястото на rs738409 е свързана с увреждане на черния дроб, чернодробна фиброза, развитие и прогресия на заболявания като НАСБ, хепатит С вирусна инфекция (HCV), както и с хепатоцелуларния карцином [259,260]. Въпреки това, физиологичните механизми все още не са напълно изяснени. Полиморфизмът на гена rs738409 засяга не само отлагането на триглицериди в черния дроб, но също и прогресията на НАСБ до НАСХ [261]. Голям мета-анализ посочва, че носителите на патологичния ген имат 73% повече чернодробни мазнини, 3.2 пъти по-висок риск от възпаление и некроза, както и 3.2 пъти по-голям риск от развитие на фиброза, отколкото носителите на здравия ген [262]. Скорошни изследвания показаха също, че този генетичен вариант увеличава риска от чернодробна цироза с 1,9 пъти, както и хепатоцелуларния карцином с 1,8 пъти [264, 265]. Трябва да се отбележи, че ролята на PNPLA3 rs738409 полиморфизмът в податливостта и прогресията на НАСБ е докладвана както при възрастни, така и при деца. В тази група, алелът 148M е свързан с по-високо съдържание на чернодробна мазнина в латиноамерикански и затлъстели тайвански деца [262,266]. Установена е също връзка с хистологичните белези на

степента на чернодробното увреждане, а именно стеатоза, хепатоцелуларно балониране и лобуларно възпаление, както и присъствие на НАСХ и фиброза при деца и юноши от бялата раса [266].
Финландска студия показа, че наличието на този вариант се асоциира със запазване на инсулиновата чувствителност и липса на хипертриглицеридемия, което означава, че представлява различен тип НАСБ, идентично на асоциацията с PNPLA3 I148M [267].

Като се имат предвид всички тези ефекти на генотипа PNPLA3, не само върху НАСБ, но и връзката му с редица други чернодробни заболявания, някои автори предлагат да се определи нова клинична единица, основана на наличието на PNPLA3 рисков алел - PNPLA3-свързан стеатохепатит (PNPLA3-associated steatohepatitis "PASH"), т.е. пациенти със стеатоза, при които PNPLA3 се явява основен участник в прогресията на заболяването в комбинация с консумация на етанол и „западна диета" [268]

Установено е, че комбинацията от генотип на PNPLA3, нивото на AST и нивото на инсулина на гладно е полезна за прогнозиране на хистологичните промени при НАСХ в кохорта пациенти с НАСБ [269]. Скорошни проучвания оценяват генотипът PNPLA3 като възможен модификатор на свързаните с НАСБ системни изменения. Авторите описват наличието на каротидна атеросклероза в сицилианска група с НАСБ и нейната връзка с няколко SNPs, включително PNPLA3 [270]. Установено е, че преобладаването на каротидни плаки и увеличаването на дебелината на интима-медиа е значително по-високо при PNPLA3 GG в сравнение с CC / CG генотипа, особено при пациенти под 50 години. Musso и съавтори свързват PNPLA3 I148M варианта с наличието на хронично бъбречно заболяване, добре познат маркер за по-висок кардиоваскуларен риск при НАСБ [271].

Може би най-вълнуващите аспекти в генетиката на НАСБ са потенциалните терапевтични възможности. Доказано е, че понижаването на експресията на PNPLA3 I148M чрез E434K вариант намалява патологичното му влияние върху НАСХ [272].

Въпреки тези констатации, далеч не всички механизми и резултати от този генетичен вариант са проучени. Необходими са бъдещи изследвания в тази насока с цел по-доброто изясняване на патогенезата, оценка на рисковите фактори и най-вече търсене на терапевтични подходи при пациенти с НАСБ носители на PNPLA3 I148M полиморфизъм.

### 4.2.2. TM6SF2

Подобни наблюдения са установени и при transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2) гена. TM6SF2 е широко експресиран в черния дроб и червата, като изпълнява ключова роля в регулацията на чернодробния липиден метаболизъм и в секрецията на богати на триглицериди липопротеини. Както PNPLA3 и този ген е локализиран в липидните капки, като инхибирането на миРНК се асоциира с повишена концентрация на триглицериди в черния дроб и на мастното съдържание в липидните капки [273]. Определен вариант в този ген показва ясна връзка със склонността към развитие на НАСБ, независимо от варианта в PNPLA3, който е идентифициран като E167K или rs58542926 [274]. Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) генът се намира на хромозома 19. TM6SF2 кодира протеин с 351 аминокиселини съдържащ седем трансмембранни домена, експресирани в черния дроб и червата при човека [275]. Установено е, първият полиморфизъм на rs58542926 C> T (E167K) в TM6SF2 е свързан с НАСБ от Genome- wide association study (GWAS) през 2014 г [274].

TM6SF2 е ген, който има изключително важно значение в хепатоцитите, като участва в трансформацията на триглицеридите до аполипопротеини B 100 по пътя на VLDL секрецията. Вариантът в този ген rs58542926 (c.449 C> T) е свързан със замяната на аминокиселината аденин с гуанин в кодиращ нуклеотид 499, както и замяна на глутамат при остатък 167 с лизин. Това заместване води до загуба на активност и впоследствие до повишено съдържание на триглицериди в черния дроб и понижено ниво на серумните липопротеини и нарушена секреция на VLDL [276]. Вариантът TM6SF2 E167K присъства в 7.2% от европейците, 3.4% от афроамериканците и 4.7% от латиноамериканците [277]. Първите доказателства за този нов SNP произлизат от три независими студии. Kozlitina и съавтори провели проучване в мултиетническа група, идентифицирайки връзката между съдържанието на чернодробни триглицериди (оценено чрез протонна магнитно-резонансна спектроскопия) и TM6SF2 полиморфизма rs58542926 [274]. Освен това, изследователите подчертават връзката между варианта TM6SF2 с по-високи серумни нива на ALT и AST и с намалени плазмени нива на триглицериди и LDL- холестерол. Накрая, те извършили функционален анализ на TM6SF2 в миши модели чрез заглушаване на гена чрез адено-асоциирани вирусни вектори. Заглушаването на гена показало трикратно увеличение на нивата на чернодробните триглицериди и намаляване на плазмените нива на ТГ, LDL, HDL и VLDL. Като цяло техните резултати показват, че генът TM6SF2 регулира секрецията на чернодробните триглицериди и че функционалното увреждане на TM6SF2 допринася за развитието на НАСБ [274]. В друго проучване се съобщава за връзка между чернодробната TM6SF2 иРНК и нивата на плазмени триглицериди, като идентифицира субклетъчната локализация и функция на TM6SF2 [278].

TM6SF2 е локализиран главно в ендоплазматичния ретикулум и апарата на Голджи. Заглушаването на TM6SF2 в хепатоцитни клетъчни линии намалява експресията на гени, участващи в синтеза на триглицериди и секретирането на богати на триглицериди липопротеини, показвайки, че TM6SF2 не само регулира секрецията на чернодробни липопротеини, но също така и участва в чернодробния синтез на триглицериди.

Едно проучване анализира връзката между TM6SF2 rs58542926 SNP и степента на чернодробното заболяване при пациенти с доказана с биопсия НАСБ. Авторите установили, че TM6SF2 rs58542926 SNP е свързан с некровъзпаление, балониране и напреднала чернодробна фиброза [279]. Взети заедно, тези студии предоставят доказателства, че TM6SF2 rs58542926 вариантът е свързан с развитието на НАСБ / НАСХ основно чрез дисрегулация на чернодробния липиден метаболизъм.

Подобно на PNPLA3 I148M, TM6SF2 E1267K полиморфизъм не само увеличава риска от стеатоза, но също така е свързан с повишен риск от прогресия на чернодробното заболяване и развитие на фиброза [280]. Интересен е фактът, че лицата, които носят този вариант имат по-висок риск за развитие на НАСБ, но по-нисък риск за ССЗ [274]. Трябва да се отбележи, че тази мутация изглежда дава сърдечно-съдова защита, поставяйки под въпрос връзката между НАСБ и сърдечно съдовите заболявания. Клиничното значение на този локус е подчертано от връзката му с коронарната артериална болест и ЗД2 [280-283].

Обратно, свръхекспресията на здравия ген TM6SF2 намалява броя и размера на липидните капчици и в крайна сметка понижава стеатозата на чернодробните клетки, но в същото време води до дислипидемия и повишен риск от ССЗ [284, 285].

Въпреки че TM6SF2 rs58542926 вариант е демонстриран в множество големи кохорти с НАСБ, вариращи от стеатоза до фиброза и цироза, някои проучвания не успяват да докажат тази връзка поради ниската алелна честота [286]. Алелната честота на този вариант възлиза на 7.2% в европейската популация, като проучване сред 361 души включващо 226 пациента с НАСБ даказана с биопсия, показва, че значението за развитие на НАСБ на този вариант е сравнително слабо, като се свързва с малко по-висок риск за развитие на НАСХ [287]. Друго проучване с 1074 участника демонстрира, че връзката между този вариант и напредналата фиброза и цироза е независима от други потенциални фактори като възраст, ИТМ, наличие на ЗД2 и PNPLA3 [288]. Голям метаанализ на публикувани 10 студии показва връзката между E167K вариант и наличието на НАСБ с общо 5537 участника, с честота на носителство над 7%, като се демонстира умерен ефект върху риска за развитие на НАСБ достигащ до 2.13 (95% доверителен интервал 1.36-3.30) [289].

Очакват се бъдещи проучвания с TM6SF2 гена, които да разкрият биологичната му функция в чернодробния липиден метаболизъм, както и връзката му със ССЗ и ЗД2.

**В обобщение,** проучванията през последните години показват, че НАСБ е заболяване, което е свързано с два големи движещи фактора, придобити и генетични, като тези разкрития ни дадоха много важни урока. На първо място, до 50% от риска и прогресията на заболяването са наследствени [290]. Основните генетични детерминанти на НАСБ в популацията включват PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K . Тези варианти на гените, както и други по-рядко срещани генетични мутации, свързани с НАСБ, подчертават важността на сформирането на липопротеините, интрахепаталната обработка на липидите и метаболизма на глюкозата в патофизиологията на НАСБ.

Второ, неблагоприятната генетика увеличава риска към заболяването, но не може да причини сама заболяване. Тази парадигма е най-забележима при PNPLA3, където носителите на I148M са много по-склонни да развият НАСБ, когато са с наднормено тегло и затлъстяване, докато слабите носители все още могат да бъдат далеч от НАСБ. Не на последно място, наличието на различни генетични вариации, както и влиянието на редица фактори от околната среда показва, че НАСБ не е едно хомогенно заболяване. Въпреки, че чернодробната стеатоза присъства при различни генетични нарушения, рискът от прогресивна чернодробна фиброза може да варира в зависимост от генетичната причина, както и от повлияването на придружаващи състояния като затлъстяване, ЗД2 и ССЗ. Разбирането на генетичните основи на НАСБ осигурява реална възможност за преосмисляне на мониторирането и лечението на пациентите с НАСБ. Въпреки, че последните препоръки на Американската асоциация за изучаване на чернодробните заболявания от 2018г. (AASLD) не препоръчват генетични изследвания в рутинната клинична практика, потенциалът на такъв подход е демонстриран в няколко скорошни проучвания [291-293]. От друга страна затлъстяването и свързаната с него инсулинова резистентност имат критично значение за развитието както на НАСБ, така и на предиабетните състояния и ЗД2. Обикновената стеатоза (НАС) и предиабетът и тяхната взаимовръзка представляват изключително голям интерес тъй като са гранични състояния, при които все още процесите са обратими и биха могли да бъдат повлияни, преди да се стигне до фиброза и респективно ЗД2 и техните усложнения. Ето защо, търсенето на нови биомаркери, вкл. и генетични, които имат връзка и с двете начални състояния и които могат да бъдат повлияни е предизвикателство за съвременната медицинска общност.

Бъдещите изследвания в тази насока ще доведат до по-доброто разбиране мужду генетичните промени и влиянието на външните фактори върху развитието както на НАСБ, така и на затлъстяването и предиабетните нарушения.

# III. Цел и задачи

**Целта** на настоящия дисертационен труд е да се оцени значението на някои нови биохимични и генетични маркери при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет.

За постигане на целта си поставихме следните задачи:

1. Да се оцени връзката на НАСБ и някои нови хепатокини, адипокини и екстрацелуларни матриксни протеини с метаболитните промени при пациенти със затлъстяване, с и без предиабет и да се установят прагови стойности на най-значимите биомаркери за разграничаване на лицата с НАСБ с и без предиабет:
   Ретинол свързващ протеин 4 (RBP4), Хемерин, Лумикан, Фибробластен растежен фатор 21 (FGF21), Wnt1-inducible signaling pathway protein-2 (WISP 2), Пентраксин 3 (PTX3), Ангиопоетин свързан растежен фактор (AGF), Фетуин А, Секс хормон свързващ глобулин (SHBG).
2. Да се оцени честотата на някои генетични полиморфизми свързани с НАСБ и връзката им с метаболитните промени при пациенти със затлъстяване с и без предиабет: Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) rs738409 (I148M) вариант и на Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) rs58542926 (TM6SF2) вариант.
3. Да се оцени връзката между утвърдени скорови системи за фиброза при НАСБ с изследваните биомаркери.
4. Да се изследват някои показатели за микро – и макроангиопатия при пациенти с НАСБ, затлъстяване с и без и предиабет и да се оцени връзката им с изследваните нови биохимични и генетични маркери.
5. Да се изведе алгоритъм на базата на изследваните биомаркери с цел ранна диагноза, профилактика и лечение на метаболитните отклонения при НАСБ, затлъстяване и предиабет.

# IV. Материали и методи

## 1. Изследвани лица

В проучването бяха включени общо 297 лица, изследвани в Клиниката по Ендокринология и болести на обмяната към УМБАЛ „Александровска“, МУ-София за периода 2017-2019 г., разпределени в следните основни групи:

1. Група 1- НАСБ със затлъстяване без въглехидратни нарушения – общо 176 пациенти
2. Група 2 – НАСБ със затлъстяване и предиабет – общо 121 пациенити

Средната възраст на изследваните болни беше 50,2±10,8 години в интервала между 27 и 78. От тях 46 мъже и 251 жени. С най-голям брой (n=21) при мъжете бяха от възрастовата група 30-39 години, следвани от интервала - 40-49 години (n=17), 8 от пациентите бяха в интервала – 60-69 години, а 1 - във възрастовата група 70-79 г. Във възрастовата група 20-29 години мъже нямаше. При жените с най-голям брой (n=77) бяха от възрастовата група 40-49 години, следвани от 66 жени – от групата 50-59 години, 44 жени - във възрастовия интервал 30-39 години, и 57 жени- в интервала 60-69 години. Пет от жените бяха в групата между 70-79 години и 1 - от възрастовата група 20-29 години.. С предиабет бяха 121 (40.74%) от пациентите, нормогликемични – 176 (59.29%). Разгърнат метаболитен синдром имаха 172 (57.91%) от болните, дислипидемия – 127 (42.76%) от болните, с артериална хипертония бяха 202 (68.01%) от пациентите и с инсулинова резистентност – 191 (64.30%) от изследваните лица. Всички изследвани пациенти имаха чернодробни трансаминази в референтни граници, както и липса на данни за субклинична атеросклероза и периферна невропатия от проведените специализирани изследвания Изключена бе напреднала фиброза и цироза на черния дроб на база ELF тест, NFS, APRI и FIB-4.

**Включващи критерии:**

- Възраст ≥18 г.
- Затлъстяване (ИТМ ≥ 30 kg/m2; и/или талия > 94 cm за мъжете и >80cm за жените)
- Нарушена гликемия на гладно (НГГ- плазмена глюкоза на гладно равна или по-висока от 5.6 mmol/l и по-ниска от 7.0 mmol/l ) и/или нарушен въглехидратен толеранс (НВТ - плазмена глюкоза на 2-я час след орално обременяване с глюкоза равна или по-висока от 7.8 mmol/l, но по-ниска от 11.1 mmol/l), HbA1c < 6,5% и ≥ 5,7%
- Ехографски базирана диагноза първична неалкохолна стеатозна болест
- Подписано информирано съгласие

**Изключващи критерии:**

- Алкохолна болест на черния дроб; консумация на алкохол > 20 g дневно абсолютен алкохол за жените и >30 g за мъжете
- Вторична неалкохолна стеатозна болест (хепатит С, прием на стеатогенни медикаменти – амиодарон, метотрексат, тамоксифен, кортикостероиди, вродени метаболитни заболявания)
- Напреднала фиброза и цироза на база ELF тест, NFS, APRI и FIB-4
- Захарен диабет (кръвна захар на гладно ≥ 7.0 mmol/l и/или случайна или на 2 час след ОГТТ ≥ 11.1 mmol/l и/или НвА1с ≥ 6.5% ).
- Неопластични заболявания
- Хронично бъбречно заболяване (хронична бъбречна болест eGFR < 60 ml/min/1.73 $m^2$ изчислен по CKD-EPI формула)
- Сърдечна недостатъчност III-IV клас по NYHA
- Друго ендокринно заболяване (Синдром на Кушинг, акромегалия, хипер-/хипотиреоидизъм и др.)
- Други придружаващи заболявания, които биха се отразили на получените резултати

При въвеждането на всеки пациент в базата данни, той получавше индивидуален идентификационен номер. За опазване на личните данни шифърът с имената на пациентите и идентификационният номер, използван при биохимичните, генетичните и инструменталните изследвания се пази при докторанта. Проучването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към МУ-София (КЕНИМУС) с протоколи № 1245/ 02.05.2017, № 4557/01.12.2017 и №1367/28.03.2019. Всички включени пациенти подписаха информирано съгласие за своето участието.

## 2. Методи

Проведени бяха следните изследвания**:**

**А) Анамнеза и физикално изследване**

**Б) Антропометрични изследвания**

- Ръст (см), тегло (кг)
- Индекс на телесна маса - ИТМ кг/м$^2$ (теглото в килограми, разделено на ръста в метри на квадрат)
- Обиколка на талията (waist circumference-WC ), измерена по средата на разстоянието между ребрената дъга и илиачния гребен
- Обиколка на ханша (hip circumference -HC), измерена на нивото на големия трохантер
- Отношението талия/ханш (waist-to-hip ratio - WHR )
- Отношение талия/ръст (waist-to-stature ratio - WSR)
- Телесен състав - оценен чрез биоимпедансен анализ (Tanita, BC408, Япония) – индекс на телесната маса (BMI), мастна маса (Fat mass), процент мастна тъкан (Fat %), свободна от мазнини маса (Fat free mass).
- VAI (visceral adiposity index; индекс за висцерално затлъстяване) - изчислен по следните формули:

За жени: VAI = ( WC 36.58 + (1.89 × BMI) ) × ( TG/ 0.81)×( 1.52/ HDL)

За мъже: VAI = ( WC 39.68 + (1.88 × BMI) ) × ( TG /1.03)×( 1.31/ HDL)

За нормални стойности се приема индекс <1,  между 1 и 2 – сива зона и >2 – за повишен кардиометаболитен риск сварзан с дисфункция на мастната тъкан.

В) **Стандартни лабораторни изследвания**,

проведени сутрин на гладно (без прием на храна в продължение най-малко на 12 часа преди изследването). Те включваха: хематологични показатели – хемоглобин, хематокрит, еритроцити, левкоцити, тромбоцити, MCV, MCH, MCHC, MPV, СУЕ; стандартни биохимични параметри, вкл. пикочна киселина, албумин, липиди - ОХ, HDL, LDL, ТГ,  АСТ, АЛТ, ГГТ, креатинин, eGFR; общо изследване на урина. Изследванията са проведени в Централна Клинична лаборатория на УМБАЛ „Александровска", която е референтна за България

**Г) ЕКГ** – 12 канален запис със стандартни критерии за оценка

**Д) Абдоминална ехография**, проведена от специалисти по гастроентерология в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ "Св. Иван Рилски" с апарат Aloka Pro Sound F75 Premier.

**Е) Основни дефиниции и диагностични методи**

*Диагнозата първична НАСБ* бе поставена според препоръките на Българското дружество по гастроентерология, гастроинтестинална ендоскопия и абдоминална ехография от 2010 г., и тези на Европейската асоциация за изучаване на черния дроб, Европейската асоциация за изучаване на диабета и Европейската асоциация за изучаване на затлъстяването от 2016 г. НАСБ бе приета при ехографски данни за стеатоза у лица, които консумират абсолютен алкохол до 30 g/дн за мъжете и 20 g/дн за жените, при изключена друга причина за чернодробно заболяване.

Изчисленията за *дневната консумация на абсолютен алкохол* са направени на базата на преизчисляване през 1 стандартна алкохолна единица, която се равнява на около 10-14 g абсолютен алкохол по формулата: 1 алкохолна единица = количеството алкохол (ml) x концентрацията (%)/ 1000. Последният се съдържа в 30-45 ml концентрирана алкохолна напитка (уиски, водка, ракия), 100-120 ml вино или 250 ml бира.

*Затлъстяване* е прието при ИТМ >30 (kg)/m$^2$ (по Класификацията на СЗО) и/или талия > 94 cm за мъжете и >80cm за жените ( по класификацията на IDF за метаболитен синдром, 2009)

За оценка на *промените в глюкозата и инсулина* използвахме следните методи и критерии:

- Стандартен ОГТТ със 75 g глюкоза, с изследване на  глюкозата на 0-ва, на 60-та и 120-та минута от обременяването.

- Серумен инсулин (на гладно, и по време на ОГТТ) – чрез електрохемилуминисцентен метод (ECLIA) проведен в Централна Клинична лаборатория на УМБАЛ “Александровска“

*Нормална гликемия на гладно/ нормален глюкозен толеранс*: Плазмена глюкоза на гладно по-ниска или равна на 5.6 mmol/l - „нормална гликемия на гладно” и плазмена глюкоза на 2-я час след орално обременяване с глюкоза - по-ниска от 7.8 mmol/l - „нормален глюкозен толеранс” .

*Предиабет* се приемаше по критериите на ADA (предвид и на използването на IDF дефиницията на МС) и и включва *Нарушена гликемия на гладно и/или нарушен глюкозен толеранс:* Плазмена глюкоза на гладно равна или по-висока от 5.6 mmol/l и по-ниска от 7.0 mmol/l - „нарушена гликемия на гладно” (НГГ) или плазмена глюкоза на 2-я час след орално обременяване с глюкоза равна или по-висока от 7.8 mmol/l, но по-ниска от 11.1 mmol/l- „нарушен глюкозен толеранс” (НГТ); HbA1c < 6,5% и ≥ 5,7%.

За оценка на *инсулиновата резистентност и чувствителност* използвахме следните сурогатни маркери:

- HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance), изчислен от стойностите на глюкозата (mmol/l) и инсулина (mU/l), измерени на гладно по следната формула - HOMA-IR = Инсулин на гладно х глюкоза /22.5. Инсулинова резистентност приехме при стойности на HOMA-IR ≥2,5.
- Индекси за инсулинова чувствителност - *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* [QUICKI Index = 1/log (кръвна захар на гладно (mmol/l)) + log (инсулин на гладно (mU/l)], *Stumvoll index* за инсулинова чувствителност [ISI Stumvoll, базиран на плазмена глюкоза (mmol/l) и инсулин (mU/l) по време на ОГТТ с или без демографски параметри ИТМ, възраст. *Bennett index* = 1/ ln (кръвна захар на гладно (mmol/l) )x ln (инсулин 0 min (mU/l)).

За поставяне на диагнозата *метаболитен синдром* използвахме критериите от *International Diabetes Federation (IDF), the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), the World Heart Federation (WHF), the International Atherosclerosis Society (IAS), and the American Heart Association (AHA), 2009.* Според тези критерии диагнозата МС се приема при наличието на поне 3 от следните 5 критерия:

1. Абдоминално затлъстяване (обиколка на талията ≥ 94 см за мъже и ≥ 80 см за жени)
2. Повишени триглицериди (> 1.7 mmol/l)

3. Намален HDL – холестерол (< 1.0 mmol/l за мъже и < 1.3 mmol/l за жените) или провеждано лечение за дислипидемия

4. Артериално налягане > 130 mm Hg за систолното или >85 mm Hg за диастолното, или прием на антихипертензивни медикаменти за лечение на артериална хипертоония

5. Плазмена глюкоза на гладно > 5.6.mmol/l или лечение на ЗД 2

*Дислипидемия* приехме при LDL ≥ 3,2 mmol/l и/или HDL ≤ 1,3 mmol/l за жените и ≤ 1,03 mmol/l за мъжете и/или триглицериди ≥ 1,7 mmol/l и/или провеждано лечение със статин, фибрат или друг медикамент.

**Ж) Други специализирани изследвания:**

*Неинвазивната оценка на чернодробна фиброза* за отхвърляне на напреднала фиброза (F3-F4) **в**ключваше изчисляване на следните скорове:

- *APRI скор* (AST to **P**latelet **R**atio **I**ndex - APRI), изчислен с калкулатор по следната формула:

$$\mathrm{APRI} = \frac{\mathrm{AST\ level\ (/ULN)}}{\mathrm{Platelet\ count\ (10^9/L)}} \mathrm{X\,100}$$

ULN = Upper Limit of Normal

Стойности < 0.5 отхвърлят наличие на фиброза; > 0.7 - предполагат напреднала фиброза (F3 - F4), а > 1 (APRI 1) скор - цироза (F4). Последната е по-сигурна при APRI скор > 2, но с по-ниска специфичност.

- *Фиброза стадий 4 (FIB-4)* бе изчислен с калкулатор на база стойностите на възраст, АСТ, АЛТ и тромбоцити по следната формула: FIB-4 = ( Age x AST) / ( Platelets x (√ ( ALT ). FIB-4 < 1.30 отхвърля напреднала фиброза (F3-F4), FIB-4 между 1.30 и 2.67 – сива зона, а FIB-4 > 2.67 предсказва напреднала фиброза (F3 – F4).

- *NFS (NAFLD fibrosis score)* бе изчислен с калкулатор на база стойностите възраст, ИТМ, НВТ или ЗД2, АСТ, АЛТ, тромбоцити и албумин. NFS < -1.455 – отхвърля сигнификантна фиброза (F0-F2), NFS между ≤ -1.455 и ≤ 0.675 – сива зона, NFS >0.675 - предиктор за наличие на сигнификантна фиброза (F3-F4).

- *ELF - тестът* на ADVIA Centaur® Enhanced Liver Fibrosis (ELF) е диагностика *in vitro* за мултивариантен индекс, предназначен да даде резултат чрез комбиниране в алгоритъм количествените измервания на хиалуронова киселина (HA), амино-терминален пропептид от тип III проколаген (PIIINP) и тъканния инхибитор на металопротеиназа 1 (TIMP-1) в човешки серум.

Тестът ADVIA Centaur ELF определя количествено анализите, които са директни маркери за чернодробна фиброза. PIIINP е маркер за ранна фиброгенеза и възпаление, TIMP-1 е циркулиращият инхибитор на MMP ензими, които могат да повишат фиброгенезата и HA е гликозаминогликан, който се произвежда от звездовидните клетки в черния дроб. Заедно тези анализи измерват качествените и количествените промени в екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ). ЕЦМ се отнася до набор от макромолекули, които изграждат извънклетъчно скелета на черния дроб. Някои ЕЦМ маркери отразяват фиброгенезата, а други отразяват регресия на фиброзата, позволяваща динамична оценка на активността на ЕЦМ. ELF резултатът, получен от алгоритъм, който комбинира индивидуалните резултати за HA, PIIINP и TIMP-1, могат да бъдат полезни за оценка на риска за чернодробна фиброза при пациенти, които са били диагностицирана с хронично чернодробно заболяване. Материал – серум REF 10492342q 2019-05-14. Изследването е напарвено с ADVIA Centaur CP system , Siemens, Germany в Клинична лаборатория на УМБАЛ "Св. Иван Рилски".

Стойности под 7.7 – изключват фиброза, между 7.7 и 9.8 се прогнозира умерена фиброза, а над 11.3 – цироза.

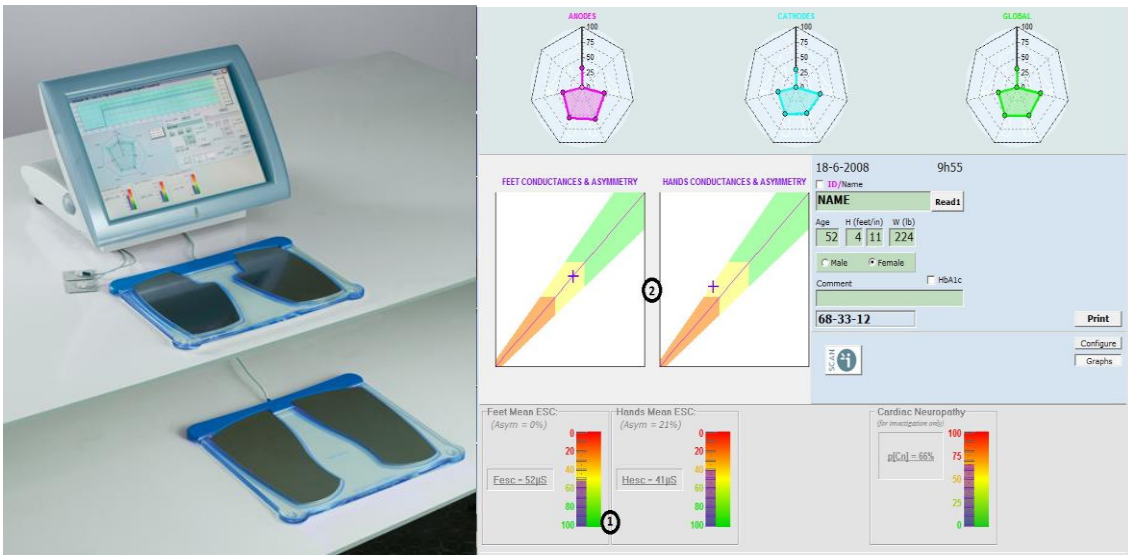
- *Индекс за чернодробна стеатоза* (Hepatic steatosis index (HSI) = 8 × (ALT/AST ratio) + BMI (+2, if female; +2, if diabetes mellitus) . HSI е лесен и ефикасен скринингов инструмент за НАСБ, който може да се използва за избор на индивиди за ехография на черния дроб и за определяне на необходимостта от модификации на начина на живот. При стойности <30.0 или >36.0, HSI изключва НАСБ с чувствителност 93.1%, или открива НАСБ със специфичност съответно 92.4% [24].

**Специализирани инструменталните изследвания**, проведени в Клиниката по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Александровска" за оценка на субклинична атеросклероза и полиневропатия:

-**Измерване на интима медиа дебелина на a. carotis com.** (IMT). Измерването на IMT е неинвазивен ултразвуков биомаркер за ранна атеросклероза. Системата Cardio Health Station (Panasonic, Japan) извършва автоматизирана оценка на IMT, вземайки предвид данните на индивидуалния пациент, като прави комбинирана оценка между данните от ехографското изследване и Frammingham risk score (традиционен сурогатен скор за оценка на сърдечно-съдовия риск). Методът е одобрен от американската Food and Drug Administration (FDA).(Фиг.3)


Фиг.3. Измерване на IMT с автоматизирана система Cardio Health Station

- Изследване за **судомоторна дисфункция** и като показател за автономната нервна система с апарат SudoScan (Impeto Medical, Paris, France) (фиг.4). SudoScan е нов метод за бърза, неинвазивна оценка и количествено измерване на судомоторната функция. За извършване на оценката на судомоторната функция се поставят нисковолтажни електроди на ръцете и краката на пациента с цел – екстракция на хлорните йони от потта. Това води до протичане на електрохимична реакция между потта и електродите. Електрохимичната потна проводимост е директно зависима от способността на потните жлези да транспортират хлорни йони и рефлектира пряко състоянието на С-влакната, оценено чрез кожна биопсия. По този начин се изчислява и риска от автономна невропатия. Методът е с добра репродуктивност – до  5-10% разлика между две последователни измервания и не се влияе от състоянието на гликемията. Също така корелира добре с утвърдените методи за оценка на периферна невропатия – VPT (Vibration Perception Threshold оценен чрез биотезиометър).




Фиг. 4. Изследване на судомоторната функция на горни и долни крайници със SudoScan

- Изчисляване на **индекса глезен/мишница** ***(Ankle-Brachial Index – ABI)***. ABI представлява отношението между систолното налягне на глезена и брахиалното систолно налягане и дава информация за наличието на периферна артериална болест. Стандартен маншон се поставят на мишницата и до глезена за измерване на артериалното налягане в легнало положение. Систоличното налягане на долните крайници се отчита с доплер-инструмент. Стойността на ниво глезен се разделя на тази на ниво мишница, като нормално стойностите варират от 0,95 до 1,2. При стойности над 0,80 клиничните оплаквания обикновено са минимални. При индекс между 0,80 и 0,40 е налице изразена исхемия и болка. При индекс под 0,40 е налице болезнена критична исхемия.
- **Изследване за наличие на периферна невропатия** – оценка на тактилен (с помощта на 10g монофиламент), температурен (с помощта на термален дискриминатор) и вибрационен усет (с помощта на 128Hz камертон и биотезиометър) и сухожилно-надкостни рефлекси (с помощта на неврологично чукче) и изчисляване на риска за периферна невропатия (Neuropathy disability score - NDS). Изследване на вибрационната чувствителност с биотезиометър (Vibration Perception Threshold (VPT) с Ultra Biotesiometer Meteda, USA). Нормална вибрационна чувствителност (нормален вибрационен праг) <25V и >25V нарушена вибрационна чувствителност.

**3) Изследвани биохимични маркери:**

***RBP4*** (Human RBP4 ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);

***Хемерин*** (Human Chemerin ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);

***Лумикан*** (Human Lumican (LUM) ELISA kit , MyBiosource, UK);

***Пентраксин 3*** ( Human Pentraxin 3 ELISA kit, Bio Vendor, Czech Repuplic);

***WISP2*** (Human WISP2 ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);

***Фетуин А*** (Human Fetuin A, ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);

***Ангиопоетин-подобен протеин 6*** (Human Angiopoietin Like Protein 6 ELISA Kit, Abbexa, UK);

***Фибробластен растежен фактор 21*** (Human Fibroblast Growth Factor 21, BioVendor)

***Секс хормон свързващ глобулин*** (SHBG ELISA kit, Dia Source, Belgium)

Пробите за оценка на серумните биомаркери бяха складирани на -80 º C при строго спазване на изискванията за преданалитичната фаза до извършване на анализа. Той бе извършен чрез имуноензимен метод ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) с помощта на комерсиално достъпни китове на апарат StatFax2100. Пробите са изработени в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“.

**И) Изследвани генетични маркери:**

**PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167К** полиморфизми е извършено в Националната Генетична Лаборатория, използвайки високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки. По международни изисквания венозната кръв се взема в пласмасова епруветка (с обем от 3–10 ml) съдържаща $K_3$ EDTA (етилен диамин тетраацетат), като антикогулант. Кръвта се съхранява при +4º C в продължение на максимум 48 часа. Ако не може да бъде обработена в този период от време, тя се замразява от –20 до–70 º C.

Аналитичната обработка включваше:

- Полимеразна верижна реакция (Polimarase Chain Reaction – PCR). Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулната диагностика. Състои се в in vitro ензимно намножаване (амплификация) на избрани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции. Методът е разработен от Kary Mullis през 1985г. Във всяка амплификационна реакция участват:

- ДНК едноверижна матрица за осъществявания процес, получена след термична денатурация на геномната ДНК;
- Taq–полимераза – осъществява процеса на намножаване на желаната ДНК последователност. Ензимът е термостабилен и запазва своята активност при 94°C. Оптималната температура за синтеза с Taq–полимеразата е 72°C. Необходимата концентрация на ензима за амплификационна реакция е 1 до 5U;
- Дезоксинуклеотидтрифосфати (дНТФ) – дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ. Служат като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига, като се включват избирателно на принципа на комплементарност. Задължително условие е четирите типа дНТФ да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес. Оптималната концентрация е 20–200 µM за всеки нуклеотид;
- Реакционен буфер – осигурява подходящото pH=8.3–9.0 на средата и необходимите йони за работа на ензима. Включва в състава си 10–50 µM Tris–HCl с pH=8.3–9.0; до 50 µM KCl и 0.5–5.0 mM $MgCl_2$. Освен това, може да

съдържа и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти (като DMSO–диметил сулфооксид) и други. Компонентите на буфера могат да варират качествено и количествено, в зависимост от изискванията на конкретната Taq–полимераза.

**Табл. 2**. Нуклеотидна последователност на праймерите, използвани за амплификация на локуси от гена за PNPLA3 I148M, TM6SF2 rs58542926

| **ГЕН** | **Нуклеотидна последователност на праймерите** |
|---|---|
| **PNPLA3 I148M** | F 5'TCAGGAAAATTAAAAGGGTGCT3'<br>R 5'TTTCTCTGCTAGCGCTGAGTC 3' |
| **TM6SF2 rs58542926** | F 5'ACAGATGTCCAGCAGGGTTC 3' .<br>R 5'TGAACTTTCCCCGTGTCAGT 3' |

## 3. Статистически анализ

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 25.0. и MedCalc Version 14.8.1. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p<0.05$.

Бяха приложени следните методи:

1. ***Дескриптивен анализ*** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.

2. ***Вариационен анализ*** – изчисляване оценките на централната тенденция и разсейване.

3. ***Графичен анализ*** – за визуализация на получените резултати.

4. ***Тестове $\chi^2$ и точен тест на Фишер*** – за търсене на зависимост между категорийни променливи.

5. ***Сравняване на относителни дялове***.

6. ***Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк*** – за проверка вида на разпределението.

7. ***Еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA*** – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.

8. ***Т-тест на Стюдънт*** –за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

9. ***Непараметричен тест на Крускал-Уолис*** – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.

10. ***Непараметричен тест на Ман-Уитни*** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

11. ***Корелационен анализ*** – за проверка наличието на линейна зависимост между количествени признаци.

12. ***Бинарна логистична регресия*** – за количествена оценка влиянието на изследваните фактори.

13. ***ROC крива*** – за определяне прагови стойности на количествени признаци с цел класификация на определени състояния.

**14. *Критерии за валидизация на скрининг тестове*.**

За оценяване ***валидността*** на скринираща (диагностицираща) тест се използват следните критерии [18]:

- Чувствителност;
- Специфичност;
- Положителна предсказваща стойност;
- Отрицателна предсказваща стойност;
- Прецизност (% на верните отговори).

**Възможни резултати от теста**

| **Резултати от теста** | **Със заболяване** | **Без заболяване** | **Общо** |
|---|---|---|---|
| Положителен | a<br>истински положителни | b<br>фалшиво положителни | a+b |
| Отрицателен | c<br>фалшиво отрицателни | d<br>истински отрицателни | c+d |
| Общо | a+c | b+d | a+b+c+d |

***Чувствителността*** (Sensitivity) представлява способността на теста да открива лицата със заболяване. Измерва се с вероятността за *позитивен* тест при скринираните *болни* лица:

$$Se = \frac{a}{a+c}$$

***Специфичността*** (Specifity) характеризира способността на теста да открива здравите лица. Измерва се с вероятността за *отрицателен* тест при скринираните *здрави* лица:

$$Sp = \frac{d}{b+d}$$

***Положителната предсказваща стойност (Positive predictive value)*** на теста се измерва с вероятността за *наличие на заболяване* при лицата с *положителен тест*:

$$PV = \frac{a}{a+b}$$

***Отрицателната предсказваща стойност (Negative predictive value)*** на теста се измерва с вероятността за *отсъствие на заболяване* при лицата с *отрицателен тест*:

$$NV = \frac{d}{c+d}$$

# V. Резултати

### Изследване на RBP4, Лумикан и Хемерин при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет

Изследваният клиничен контингент обхващаше 79 пациенти, от които 6 (7,6%) мъже и 73 (92,4%) жени. Средната възраст на участниците в проучването е 50,9±11,1 години в интервала между 25 и 73.

Резултатите от сравнителния анализ между групите с и без предиабет по възраст и антропометрични характеристики са представени на таблица 3.

**Табл. 3**. Характеристика на пациентите със затлъстявене без и с предиабет по възраст и антропометрични показатели, изследвани за RBP4, Хемерин и Лумикан.

| **Показатели** | **Без предиабет n=41** | | **С предиабет n=38** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Възраст (години) | 51,20 | 12,97 | 50,68 | 8,83 | 0,840 |
| ИТМ (кг/м2) | 36,68 | 6,05 | 36,33 | 5,24 | 0,741 |
| Талия (см) | 110,07 | 12,38 | 107,36 | 14,65 | 0,262 |
| Ханш (см) | 119,05 | 11,02 | 116,89 | 11,34 | 0,631 |
| Мастна тъкан (%) | 45,84 | 5,44 | 46,63 | 5,51 | 0,437 |
| WHR | 0,912 | 0,073 | 0,908 | 0,067 | 0,850 |
| WSR | 0,687 | 0,082 | 0,664 | 0,092 | 0,271 |
| VAI | 1,71 | 0,90 | 3,04 | 1,49 | **<0,001** |

Не се установи разлика по възраст, ИТМ, талия, ханш, мастна тъкан, WHR и WSR. Сигнификантна разлика се установи само при VAI. Със значимо по-висока средна стойност беше групата със затлъстяване и предиабет ( 3,04±1,49 с/у 1,71±0,90, p<0,001).

Сравнителният анализ на изследваните групи по артериално налягане, липиден профил, кръвна захар и инсулин от ОГТТ, HOMA-IR, Quicky и Stumwoll са представени на **табл 4.**

**Табл. 4**. Характеристика на пациентите без и с предиабет по артериално налягане, липиден профил, кръвна захар и инсулин от ОГТТ, HOMA-IR, Quicky индекс и Stumwoll индекс, изследвани за RBP4, Хемерин и Лумикан.

| **Показатели** | **Без предиабет n=41** | | **С предиабет n=38** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| САН (mmHg) | 130,24 | 17,14 | 131,95 | 17,89 | 0,948 |
| ДАН (mmHg) | 83,54 | 10,68 | 84,45 | 10,16 | 0,928 |
| Общ холестерол (mmol/l) | 5,06 | 1,05 | 5,22 | 1,17 | 0,540 |
| HDL холестерол (mmol/l) | 1,42 | 0,29 | 1,10 | 0,25 | **<0,001** |
| LDL холестерол (mmol/l) | 3,05 | 1,02 | 3,13 | 0,94 | 0,753 |
| VLDL холестерол (mmol/l) | 0,51 | 0,24 | 0,76 | 0,30 | **0,001** |
| ТГ (mmol/l) | 1,143 | 0,510 | 1,733 | 0,753 | **<0,001** |
| КЗ 0 (mmol/l) | 5,30 | 0,42 | 6,13 | 0,52 | **<0,001** |
| КЗ 60 (mmol/l) | 7,20 | 2,16 | 9,82 | 2,37 | **<0,001** |
| КЗ 120(mmol/l) | 5,37 | 1,17 | 7,35 | 1,86 | **<0,001** |
| Инсулин 0 (mU/L) | 11,88 | 5,57 | 16,87 | 7,40 | **0,004** |
| Инсулин 60 (mU/L) | 82,07 | 60,07 | 103,57 | 49,41 | **0,030** |
| Инсулин 120 (mU/L) | 39,40 | 23,01 | 98,13 | 64,15 | **<0,001** |
| HOMA-IR | 2,82 | 1,42 | 4,36 | 2,27 | **0,002** |
| Quicky | 2,25 | 1,00 | 1,51 | 0,53 | **0,001** |
| Stumwoll | 0,057 | 0,023 | 0,045 | 0,045 | 0,322 |

Сигнификантна разлика се установи при HDL, VLDL, ТГ, кръвна захар и инсулин от ОГТТ, индексите HOMA и Quicky. Със значимо по-висока средна стойност в групата със затлъстяване без предиабет бяха HDL и индекса Quicky, докато останалите показатели със статистически достоверно по-висока средна стойност бяха от групата със затлъстяване и предиабет.

Сравнителният анализ на пациентите без и с предиабет по Лумикан, Хемерин и RBP4 е представен на **табл. 5**.

**Табл. 5**. Сравнителен анализ на пациентите без и с предиабет по Лумикан, Хемерин и RBP4

| **Показатели** | **Без предиабет n=41** | | **С предиабет n=38** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Лумикан | 0,080 | 0,048 | 0,117 | 0,074 | **0,010** |
| Хемерин | 196,01 | 39,56 | 192,34 | 47,66 | 0,710 |
| RBP4 | 65,30 | 32,25 | 78,55 | 35,74 | **0,041** |

Значимо по-високи средни стойности за **Лумикан и RBP4** се наблюдаваха в групата с предиабет.

**Анализ на пациентите без и с метаболитен синдром по Лумикан, Хемерин и RBP4**

Резултатите от сравнителния анализ между групите без и с МС по Лумикан, Хемерин и RBP4 са представени на **табл. 6**

**Табл. 6.** Сравнителен анализ на пациентите с и без МС по Лумикан, Хемерин и RBP4

| **Показатели** | **Без МС n=27** | | **С МС n=52** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Лумикан | 0,079 | 0,048 | 0,107 | 0,070 | 0,058 |
| Хемерин | 190,81 | 40,32 | 196,02 | 45,19 | 0,616 |
| RBP4 | 61,49 | 33,97 | 76,93 | 33,70 | **0,019** |

Сигнификантна разлика се установи само при **RBP4**. Със значимо по-висока средна стойност беше групата на имащите МС.

**Анализ на пациентите без и с артериална хипертония по Лумикан, Хемерин и RBP4**

Между групите без и с **артериална хипертония** не се установи сигнификантна разлика по Лумикан, Хемерин и RBP4 (**табл. 7)**.

**Табл. 7**: Сравнителен анализ на пациентите с и без артериална хипертония по Лумикан, Хемерин и RBP4

| **Показател** | **Без артериална хипертония n= 22** | | **С артериална хипертония n =57** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Лумикан | 0,087 | 0,062 | 0,102 | 0,066 | 0,383 |
| Хемерин | 197,42 | 35,80 | 193,01 | 46,23 | 0,755 |
| RBP4 | 72,54 | 35,07 | 71,21 | 34,41 | 0,938 |

**Анализ на пациентите без и с дислипидемия по RBP4, Хемерин и Лумикан**

Класифицирането на пациентите с дислипидемия е дадено в глава Материали и методи, подточка Е. Основни дефиниции и диагностични методи.

Сравнителният анализ на пациентите без и с дислипидемия по Лумикан, Хемерин и RBP4 е представен на **табл.8**.

**Табл. 8**. Сравнителен анализ на пациентите без и с дислипидемия по Лумикан, Хемерин и RBP4

| **Показатели** | **Без дислипидемия n=41** | | **С дислипидемия n=38** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Лумикан | 0,089 | 0,056 | 0,104 | 0,071 | 0,441 |
| Хемерин | 188,67 | 39,40 | 199,76 | 47,68 | 0,265 |
| RBP4 | 65,13 | 38,09 | 78,42 | 28,89 | **0,013** |

Сигнификантна разлика се установи само при **RBP4**, където със значимо по-висока средна стойност беше групата на имащите дислипидемия.

Резултатите от корелационния анализ между Лумикан, Хемерин и RBP4 и антропометричните показатели, артериално налягане, липиден профил, КЗ и инсулин от ОГТТ, индекси HOMA, Quicky, Stumwoll могат да се видят на **табл. 9**

**Табл. 9.** Коефициенти на корелация между Лумикан, Хемерин и RBP4 и антропометричните показатели, артериално налягане, липиден профил, кръвна захар и инсулин от ОГТТ, индекси HOMA, Quicky, Stumwoll

| Показатели | Лумикан | Хемерин | RBP4 |
|---|---|---|---|
| Възраст | 0,047 | -0,109 | -0,017 |
| САН | -0,076 | 0,007 | 0,075 |
| ДАН | -0,118 | -0,013 | 0,077 |
| ИТМ | -0,146 | **0,320**** | 0,044 |
| Обиколка на талията | **-0,324**** | 0,187 | -0,027 |
| Обиколка на ханша | -0,237 | **0,296*** | 0,055 |
| WHR | -0,030 | -0,025 | -0,095 |
| WSR | **-0,313*** | 0,232 | -0,006 |
| VAI | 0,223 | **0,297*** | **0,483***** |
| Мазнини % | -0,246 | 0,050 | 0,048 |
| КЗ 0 | **0,228*** | -0,072 | **0,332**** |
| КЗ 60 | 0,191 | 0,039 | **0,306**** |
| КЗ 120 | 0,113 | 0,188 | 0,009 |
| Инсулин 0 | -0,122 | 0,218 | **0,300*** |
| Инсулин 60 | -0,090 | 0,057 | 0,237 |
| Инсулин 120 | 0,012 | 0,168 | **0,247*** |
| HOMA-IR | -0,097 | 0,196 | 0,283* |
| Quicky | 0,026 | -0,203 | **-0,325**** |
| ISIstumvoll | 0,207 | -0,205 | -0,069 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Резултатите показаха, че Лумикан корелира обратнопропорционално и умерено силно с показателите обиколка на талия (p= -0,324) и WSR (p= -0,313), а слабо и правопропорционално с КЗ на 0 мин. (p= 0,228). Хемерин корелираше правопропорционално с показателите ИТМ (p= 0,320), обиколка на ханша (p= 0,296) и VAI (p= 0,297). С първият показател силата на корелацията е умерена, а с останалите два – слаба. RBP4 корелираше правопропорционално с показателите VAI (p= 0,483), КЗ на 0 мин. (p= 0,332), КЗ на 60 мин. (p=0,306), Инсулин на 0 мин. (p=0,300), Инсулин на 120 мин.(p=0,247) и HOMA-IR (p=0,283) и обратнопропорционално с Quicky индекс (p=-0,325). С Инсулин на 120 мин. и HOMA-IR силата на корелацията е слаба, а с останалите – умерена.

**Изследване на връзката между нивата на Лумикан, Хемерин, RBP4 и индекса за чернодробна стеатоза (HSI), индекса глезен мишница (ABI), интима медиа дебелина (IMT), индекса за периферна невропатия (NDS), вибрационен праг (VPT) и риска за автономна невропатия (ANR)**

Резултатите от коефициентите на корелация между Лумикан, Хемерин и RBP4 и HSI, ABI, NDS, VPT и ANR при пациенти с и без предиабет са представени на табл. 10 и 11.

**Табл. 10.** Коефициенти на корелация между Лумикан, Хемерин и RBP4 и HSI, ABI, NDS, VPT и ANR **(пациенти без предиабет)**

| Показатели | Лумикан | Хемерин | RBP4 |
|---|---|---|---|
| HSI | 0,149 | 0,171 | -0,021 |
| ABI | -0,116 | -0,144 | -0,020 |
| IMT | -0,085 | -0,024 | 0,037 |
| NDS | 0,203 | 0,017 | -0,050 |
| VPT | -0,150 | -0,261 | 0,008 |
| ANR | -0,237 | 0,125 | -0,017 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

**Табл. 11.** Коефициенти на корелация между Лумикан, Хемерин и RBP4 и HSI, ABI, NDS, VT и ANR (**пациенти с предиабет**)

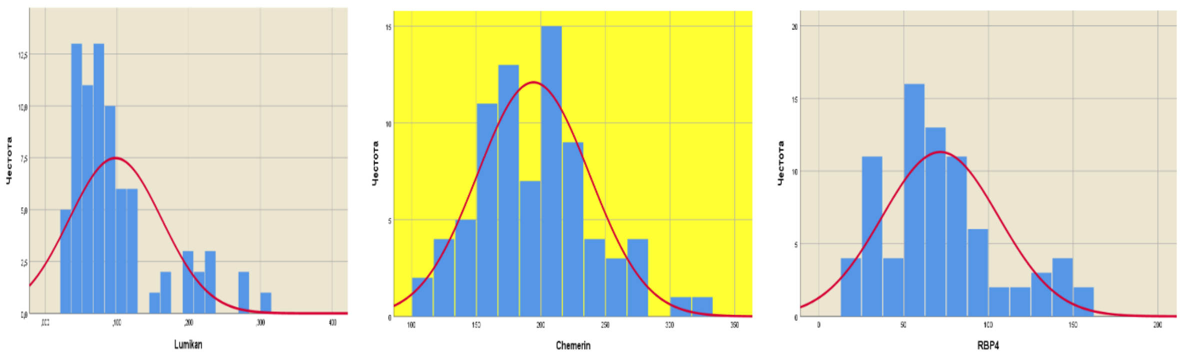
| **Показатели** | **Лумикан** | **Хемерин** | **RBP4** |
|---|---|---|---|
| HSI | -0,255 | **0,637**** | 0,238 |
| ABI | -0,196 | -0,110 | -0,271 |
| IMT | -0,136 | 0,088 | 0,208 |
| NDS | 0,125 | 0,399 | 0,255 |
| VPT | -0,252 | -0,017 | -0,035 |
| ANR | -0,224 | 0,191 | 0,103 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Анализазът показа, че единствено **Хемерин** корелира изразено и провопропорционално с индекса за чернодробна стеатоза (HSI) (p= 0,550) и то само в групата с предиабет.

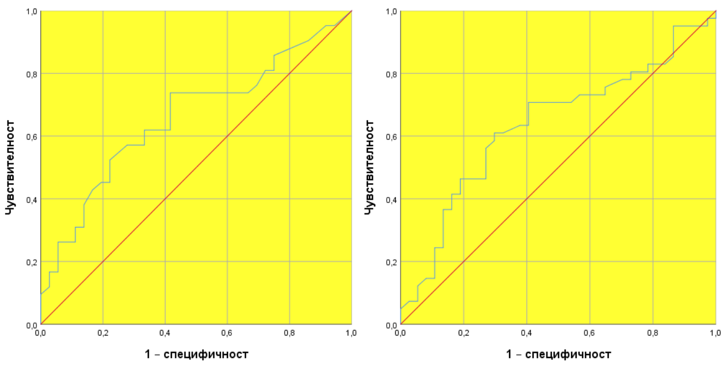
**Определяне на предиктивната стойност на RBP4, Хемерин и Лумикан за риск от предиабет**

За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ. Поради това, че от изследваните количествени показатели само Хемерин има нормално разпределение **(фиг.4)** за останалите два бе приложен метода на ROC кривите за установяване на сигнификантна прагова стойност **(фиг.5).**




а б в

**Фиг. 4**. Честотно разпределение на изследвания контингент по Лумикан, $p<0,001$ (а); Хемерин, $p=0,200$ (б); RBP4, $p=0,049$ (в)




**а** **б**

**Фиг. 5**. ROC крива на (а) Лумикан (AUC= 0,660, $p=0,015$), и (б) RBP4 (AUC= 0,636, $p=0,038$) за определяне на праговите им стойности при отграничаването на пациенти с и без предиабет

При така установените прагови стойности (≥ 0,07 ng/ml за Лумикан и ≥ 61 mcg/ml за RBP4), стойностите на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет имаха сравнително невисоки, но приемливи проценти **(табл. 12).**

**Табл.12.** Прагова величина на Лумикан, RBP4 и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет

| **Показател** | **Прагова величина** | **Чувствителност (%)** | **Специфичност (%)** | **Положителна предиктивна стойност (%)** | **Отрицателна предиктивна стойност (%)** | **Прецизност (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Лумикан (ng/ml) | ≥ 0,07 | 74 | 58 | 67 | 66 | 67 |
| RBP4 (mcg/ml) | ≥ 61 | 71 | 59 | 66 | 65 | 65 |

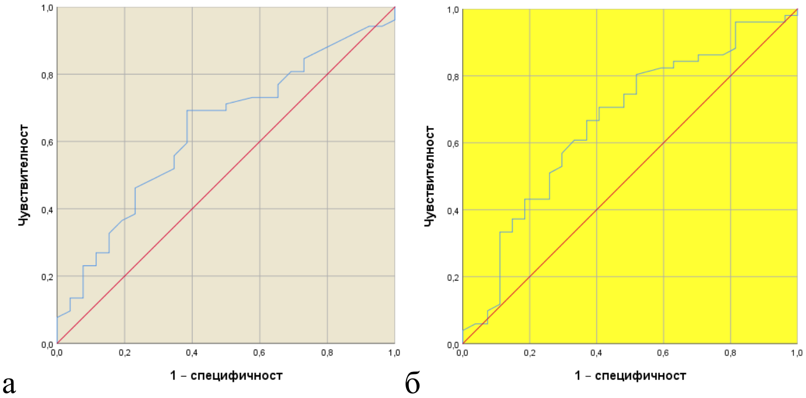
Бинарната логистична регресия даде следните резултати:

При пациентите с нива на **Лумикан ≥ 0,07 ng/ml** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на предиабет е **3,9 пъти по-висок** (OR 3,945, 95% CI 1,518-10,254, p=0,005). При пациентиет с нива на **RBP4 ≥ 61 mcg/ml** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на предиабет е **3,5 пъти по-висок** (OR 3,544, 95% CI 1,385-9,072, p=0,008). При Хемерин отношението на шансовете нямаше статистическа достоверност. В групов план показателите Лумикан и RBP4 запазиха рисковите си предиктивни стойности.

**Определяне на предиктивната стойност на Лумикан, Хемерин, RBP4 за риск от МС**

За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ за двете групи пациенти – с и без метаболитен синдром.

От изследваните количествени показатели нормално разпределение имаше Хемерин **(фиг.5).** За останалите бе приложен метода на ROC кривите за установяване на сигнификантни прагови стойности **(фиг.6).**




а б

**Фиг. 6.** ROC крива на (а) Лумикан (AUC = 0,632, p=0,058), (б) RBP4 (AUC= 0,662, p=0,019) за определяне на праговите им стойности при отграничаването на пациенти с и без метаболитен синдром

Бинарната логистична регресия даде следните резултати:

При пациенти със стойности на **RBP4 ≥ 55 mcg/ml** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на МС е **3,1 пъти по-висок** (OR 3,148, 95% CI 1,178-8,414, p = 0,022). При Лумикан и Хемерин отношението на шансовете нямаше статистическа достоверност.

## 1. Изследване на WISP2, PTX3, ELF, FIB-4, NFS, APRI, Фетуин A, FGF 21, AGF, SHBG и генетичните полиморфизми PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет

Изследваният клиничен контингент обхващаше общо 218 пациенти, от които 40 (18,3%) мъже и 178 (81,7%) жени. Средната възраст на участниците в проучването беше 50,22±10,86 години в интервала между 27 и 78 години.

Резултатите от сравнителния анализ между групите със затлъстяване без и с предиабет по възраст и антропометрични характеристики са представени на **табл.13.**

**Табл. 13.** Сравнителен анализ на изследваните групи по възраст и антропометричните показатели.

| Показатели | Без предиабет n =135 | | С предиабет n= 83 | | P |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Възраст (години) | 48,29 | 10,82 | 53,36 | 10,25 | **0,001** |
| ИТМ (кг/м$^2$) | 37,33 | 6,63 | 37,74 | 5,84 | 0,341 |
| Талия (см) | 110,36 | 14,02 | 113,20 | 12,88 | 0,115 |
| Ханш (см) | 118,70 | 13,07 | 117,99 | 11,91 | 0,660 |
| WHR | 0,93 | 0,12 | 0,95 | 0,14 | **0,033** |
| WSR | 0,67 | 0,09 | 0,69 | 0,08 | 0,103 |
| VAI | 1,82 | 0,97 | 3,53 | 1,53 | **<0,001** |
| Мастна тъкан (%) | 46,08 | 4,58 | 46,73 | 6,93 | 0,217 |

Сигнификантна разлика се установява само при възрастта, WHR и VAI, като със значимо по-високи средни стойности е групата с предиабет (p= 0,001; p=0,033; p<0,001, съответно).

Тъй като има статистически значима зависимост между възрастта и мастната тъкан **(табл.13)** двете изследвани групи бяха предварително уеднаквени статистически по този замъгляващ показател. Едновременно с това бяха изравнени и по полова принадлежност – също известен замъгляващ фактор.

Проведеният корелационен анализ показа наличие на сигнификантна зависимост на възрастта единствено с показателя мастна тъкан (p<0,05)(табл. 14).

**Табл.14.** Корелационен анализ на възрастта и антропометричните показатели

| **Показатели** | **Възраст (години)** |
|---|---|
| ИТМ (кг/м2) | -0,028 |
| Талия (см) | -0,050 |
| Ханш (см) | -0,022 |
| WHR | -0,050 |
| WSR | 0,055 |
| VAI | -0,004 |
| Мастна тъкан (%) | 0,331* |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Сравнителеният анализ на изследваните групи по артериално налягане, липиден профил, кръвна захар и инсулин от ОГТТ на 0, 60 и 120 мин., индексите HOMA- IR, Quicky, Stumwoll, Bennett са представени на **таблица 15.**

**Табл. 15.** Сравнителен анализ на изследваните групи по артериално налягане, липиден профил. КЗ 0 -кръвна захарна на 0 мин. от ОГТТ, КЗ 60 – кръвна захар на 60 мин, КЗ120 – кръвна захар на 120 мин. и инсулин на 0, 60 и 120 мин. от ОГТТ, индекси HOMA- IR, Quicky, Stumwoll, Bennett

| **Показатели** | **Без предиабет n=135** | | **С предиабет n=83** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| САН (mmHg) | 132,07 | 16,22 | 135,21 | 15,80 | 0,149 |
| ДАН (mmHg) | 81,63 | 10,02 | 85,18 | 10,25 | **0,021** |
| Общ холестерол (mmol/l) | 5,18 | 1,02 | 5,28 | 0,98 | 0,329 |
| HDL (mmol/l) | 1,30 | 0,33 | 1,17 | 0,27 | **0,007** |
| LDL (mmol/l) | 3,22 | 0,89 | 3,17 | 0,93 | 0,699 |
| VLDL (mmol/l) | 0,65 | 0,28 | 0,85 | 0,31 | **<0,001** |
| ТГ (mmol/l) | 1,51 | 0,81 | 2,10 | 1,00 | **<0,001** |
| КЗ 0 (mmol/l) | 5,33 | 0,52 | 6,90 | 2,69 | **<0,001** |
| КЗ 60 (mmol/l) | 8,36 | 2,31 | 11,10 | 2,50 | **<0,001** |
| КЗ 120 (mmol/l) | 5,55 | 1,48 | 8,63 | 2,31 | **<0,001** |
| Инсулин 0 (mU/L) | 15,03 | 8,67 | 25,24 | 29,26 | **<0,001** |
| Инсулин 60 (mU/L) | 107,03 | 67,83 | 136,66 | 105,68 | **0,024** |
| Инсулин120 (mU/L) | 53,40 | 42,81 | 123,93 | 136,34 | **<0,001** |
| HOMA-IR | 3,53 | 2,20 | 7,04 | 8,40 | **<0,001** |
| Quicky | 2,63 | 5,37 | 1,32 | 0,44 | **<0,001** |
| Stumwoll | 0,05 | 0,04 | 0,01 | 0,08 | **<0,001** |
| Bennett | 1,32 | 0,32 | 1,03 | 0,28 | **<0,001** |

Резултатите от анализа показаха, че между групите със затлъстяване без въглехидратни нарушения и затлъстяване с предиабет сигнификантна разлика се установи при ДАН, HDL, VLDL, ТГ, КЗ и инсулин от ОГТТ, индексите HOMA-IR, Quicky, Stumwoll, Bennett. Със значимо по-висока средна стойност в групата на предиабет бяха ДАН ($p=0,021$), VLDL ($p<0,001$), ТГ ($p<0,001$), КЗ и инсулина от ОГТТ във всеки един от моментите на измерване ($p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,01$, $p=0,024$, $p<0,001$, съответно), индекса HOMA-IR ($p<0,01$). В групата само със затлъстяване статистически достоверно по-високи стойности се установиха при HDL ($p=0,007$) и индексите Quicky ($p<0,01$), Stumwoll ($p<0,01$) и Bennett ($p<0,01$).

## 2.1. Изследване на WISP2, PTX3, ELF и неговите компоненти (HA, PIIINP, TIMP-1), и фиброзните скорове FIB-4, NFS и APRI

Анализ на нивата на WISP2, PTX3, ELF и неговите компоненти ( HA, PIIINP, TIMP-1) между затлъстяване и предиабет, между пациенти с/без МС, с/без артериална хипертония и с/без дислипидемия. Анализ на тези показатели бе направен и при различните видове въглехидратни нарушения, както и при ИР. За да се осигури коректност на последващия сравнителен анализ предварително бе установено кои от показателите WISP2, ELF и неговите компоненти (HA, PIIINP, TIMP-1), и PTX3 корелират с възрастта **(табл. 16)**. Това са HA, PIIINP и ELF. При сравняването по тези показатели предварително бе изравнена статистически възрастта на съответните групи.

**Таблица 16**: Корелационен анализ на възрастта и WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3

| Показатели | Възраст (години) |
|---|---|
| WISP2 | 0,135 |
| HA | **0,636*** ** |
| PIIINP | **0,310*** |
| TIMP-1 | 0,086 |
| ELF | **0,663*** ** |
| PTX3 | 0,033 |

* - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$

Резултатите от сравнителния анализ между групите без и с предиабет по WISP2, HA, PIIINP, TIMP-1, ELF и PTX3 са представени на **таблица 17**.

**Табл. 17.** Сравнителен анализ на изследваните групи по WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3

| Показатели | Без предиабет | | | С предиабет | | | P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | $\overline{X}$ | SD | n | $\overline{X}$ | SD | |
| WISP2 | 47 | 768,78 | 593,23 | 32 | 630,85 | 256,49 | 0,704 |
| HA | 32 | 39,15 | 34,12 | 16 | 52,03 | 37,88 | 0,128 |
| PIIINP | 32 | 8,56 | 2,85 | 16 | 8,89 | 2,48 | 0,650 |
| TIMP-1 | 34 | 215,62 | 42,76 | 18 | 228,16 | 51,10 | 0,352 |
| ELF | 34 | 9,11 | 0,84 | 18 | 9,34 | 0,72 | 0,256 |
| PTX3 | 47 | 1877,03 | 895,45 | 30 | 2321,29 | 926,63 | **0,028** |

Анализът показа, че сигнификантна разлика се установява само при **PTX3**. Със значимо по-висока средна стойност беше групата на предиабет (2321,29±926,63 с/у 1877,03±895,45 pg/ml, p=0,028). Последващите сравнения показаха, че наличието на хипертония, дислипидимия, МС и броя на компонентите на МС не оказват влияние върху нивата на показателите WISP2, ELF и неговите компоненти (HA, PIIINP, TIMP-1) и PTX3.

Резултатите от проведеният корелационен анализ за наличието на зависимост между нивата на WISP2, PTX3, ELF и неговите компоненти (HA, PIIINP, TIMP-1) и антропометричните показатели (възраст, ИТМ, талия, ханш, WHR, WSR, VAI), артериално налягане, липиден профил, КЗ и инсулин от ОГТТ (0, 60, 120 min), индексите HOMA-IR, Quicky, Stumwoll, Bennett са представени на **табл. 18.**

**Табл. 18**. Корелационен анализ на WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3 и показателите ИТМ, талия, ханш, мастна тъкан, WHR, WSR, VAI, САН, ДАН, TC, HDL, LDL, ТГ, КЗ и инсулин от ОГТТ (0, 60, 120 min), индекси HOMA, Quicky, Stumwoll, Bennett;

| **Показатели** | **WISP2** | **HA** | **PIIINP** | **TIMP-1** | **ELF** | **PTX3** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ИТМ (кг/м2) | 0,033 | -0,028 | -0,153 | 0,241 | -0,103 | 0,005 |
| Талия (см) | 0,100 | -0,018 | -0,187 | 0,092 | -0,137 | 0,189 |
| Ханш (см) | 0,140 | 0,098 | 0,005 | 0,287 | 0,085 | 0,107 |
| WHR | 0,007 | -0,172 | -0,194 | -0,138 | -0,256 | 0,139 |
| WSR | 0,048 | 0,112 | -0,126 | 0,125 | -0,003 | 0,201 |
| VAI | **0,237*** | 0,178 | 0,215 | 0,209 | 0,157 | 0,162 |
| Мастна тъкан (%) | 0,008 | -0,036 | -0,155 | -0,035 | -0,026 | -0,087 |
| САН (mmHg) | 0,050 | -0,009 | 0,012 | 0,141 | 0,022 | 0,085 |
| ДАН (mmHg) | 0,040 | -0,067 | -0,070 | 0,053 | -0,070 | 0,081 |
| TC (mmol/l) | 0,159 | 0,033 | 0,005 | 0,088 | 0,003 | -0,049 |
| HDL (mmol/l) | -0,109 | 0,099 | -0,062 | -0,149 | 0,116 | -0,081 |
| LDL (mmol/l) | 0,040 | -0,014 | -0,029 | 0,070 | -0,093 | -0,028 |
| VLDL(mmol/l) | 0,233 | 0,219 | 0,067 | -0,021 | 0,217 | 0,139 |
| ТГ (mmol/l) | **0,290**** | 0,134 | 0,166 | 0,084 | 0,166 | 0,191 |
| КЗ 0 (mmol/l) | 0,152 | 0,195 | 0,137 | 0,044 | 0,181 | 0,111 |
| КЗ 60 (mmol/l) | 0,077 | 0,262 | 0,181 | 0,068 | **0,347*** | 0,089 |
| КЗ 120 (mmol/l) | 0,111 | 0,199 | 0,090 | 0,133 | 0,164 | 0,131 |
| Инсулин 0 | 0,057 | 0,237 | 0,118 | -0,057 | 0,140 | 0,106 |
| Инсулин 60 | 0,031 | 0,251 | 0,043 | -0,130 | 0,194 | 0,062 |
| Инсулин 120 | 0,067 | **0,298*** | 0,135 | 0,081 | 0,238 | 0,078 |
| HOMA-IR | 0,065 | 0,217 | 0,140 | -0,023 | 0,134 | 0,106 |
| Quicky | -0,062 | -0,247 | -0,142 | 0,018 | -0,157 | -0,113 |
| Stumwoll | -0,096 | -0,228 | -0,035 | -0,274 | -0,150 | -0,073 |
| Bennett | -0,073 | -0,258 | -0,168 | -0,011 | -0,174 | -0,106 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Анализът показа, че WISP2 корелира слабо и правопропорционално с VAI и ТГ ($p<0,05$ и $p<0,01$,съответно), HA корелира слабо и правопропорционално с инсулина на 120 min ($p<0,05$) и ELF корелира правопропорционално и умерено по сила с КЗ 60 min ($p<0,05$).

Наличие на сигнификантна зависимост между показателите WISP2, HA, PIIINP, TIMP-1, ELF и PTX3 и **инсулиновата резистентност** не бе установена**. (Табл. 19)**

**Табл. 19:** Сравнителен анализ на пациентите без и с ИР по WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3

| **Показател** | **Без ИР n =59** | | **С ИР n= 152** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Възраст (години) | 48,34 | 10,36 | 50,74 | 10,96 | 0,197 |
| WISP2 | 704,39 | 544,59 | 717,31 | 471,14 | 0,649 |
| HA | 39,26 | 36,71 | 35,84 | 31,10 | 0,832 |
| PIIINP | 7,99 | 2,70 | 8,32 | 2,77 | 0,563 |
| TIMP-1 | 224,98 | 43,64 | 216,15 | 48,00 | 0,602 |
| ELF | 9,06 | 0,94 | 8,90 | 0,78 | 0,923 |
| PTX3 | 1943,86 | 864,85 | 2046,77 | 891,17 | 0,789 |

Проведеният корелационен анализ за наличието на зависимост между нивата на WISP2, PTX3, ELF и неговите компоненти (HA, PIIINP, TIMP-1) и индекса за чернодробна стеатоза (HSI), индекса глезен мишница (ABI), интима медиа дебелина (IMT), индекса за периферна невропатия (NDS), вибрационенния праг (VPT) и риска за автономна невропатия (ANR), установи следните корелации **(табл. 20):**

**Табл. 20.** Корелационен анализ на WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3 и HSI,  ABI, NDS, VT и ANR

| **Показатели** | **WISP2** | **HA** | **PIIINP** | **TIMP-1** | **ELF** | **PTX3** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HSI | -0,141 | 0,055 | -0,054 | **0,307*** | -0,020 | 0,073 |
| ABI | **0,356**** | 0,070 | 0,260 | 0,244 | 0,025 | -0,056 |
| IMT | 0,154 | **0,485**** | 0,159 | 0,178 | **0,438**** | 0,094 |
| NDS | 0,052 | **0,441**** | 0,242 | 0,136 | 0,376* | **0,236*** |
| VPT | **0,314**** | 0,229 | 0,250 | 0,073 | 0,271 | -0,081 |
| ANR | 0,185 | 0,283 | 0,031 | -0,004 | 0,152 | -0,010 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

WISP2 корелира умерено и правопропорционално с ABI и VPT (p<0,01), HA и ELF корелират умерено и правопропорционално с IMT и NDS (p<0,01;  p<0,01; p<0,01; p<0,05, съответно), TIMP-1 корелира правопропорционално и умерено по сила с HSI (p<0,05), PTX3 корелира слабо и правопропорционално с NDS (p<0,05).

Резултатите от сравнителния анализ между групите без и с предиабет по отношение на фиброзните скорове FIB-4 и APRI са показани на **табл. 21.**

**Табл. 21.** Сравнителен анализ на пациентите без и с  предиабет по фиброзните скорове FIB-4 и APRI

| **Показател** | **Без предиабет n= 121** | | **С предиабет n= 84** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| FIB-4 | 0,83 | 0,34 | 0,89 | 0,34 | 0,198 |
| APRI | 0,17 | 0,08 | 0,21 | 0,10 | **0,031** |

Резултатите показаха, че няма сигнификантна разлика между средните стойности на FIB-4 в двете изследвани групи (p=0,198). Пациентите с и без предиабет се различават статистически значимо по показателя **APRI,** като с по-висока средна стойност е групата с предиабет (p=0,031).

Сравнителният анализ на пациентите **с и без МС** по FIB-4 и APRI показа липса на сигнификантна разлика между изследваните групи по тези показатели.

Оценката на влиянието на компонентите затлъстяване, дислипидемия и артериална хипертония върху фиброзните скорове FIB-4 и APRI беше осъществена чрез сравнителен анализ. От тях става ясно, че единствено дислипидемията води до сигнификантно по-високи стойности на показателя **APRI** (0,20±0,09 с/у 0,18±0,09, p=0,036).

Проведеният корелационен анализ установи наличие на слаба корелация единствено между инсулина на 120 мин. и APRI **(табл. 22).** Инсулиновата резистентност не е предиктор за FIB-4 и APRI (p= 0,630, p=0,709, съответно).

**Табл.22.** Корелационен анализ на FIB-4, APRI и инсулин от ОГТТ (0, 60, 120 min)

| **Показатели** | **FIB-4** | **APRI** |
|---|---|---|
| Инсулин 0 | -0,104 | 0,054 |
| Инсулин 60 | 0,002 | 0,031 |
| Инсулин 120 | 0,074 | **0,177*** |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Корелационният анализ между фиброзните скорове ELF, FIB-4, NFS, APRI и HSI, WISP2 и PTX2 показа следните резултати **(Табл. 23):**

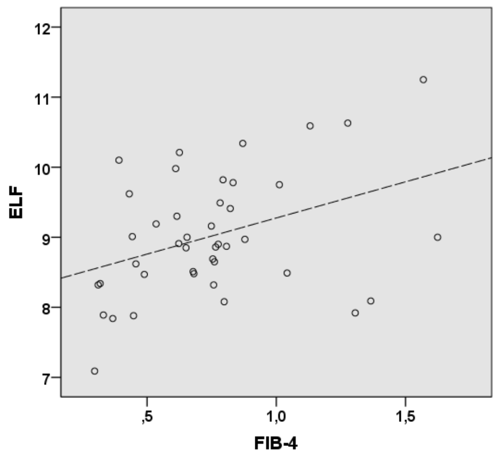
**Табл. 23.** Корелационен анализ между показателите ELF, HSI, WISP2, PTX3, FIB-4 и APRI.

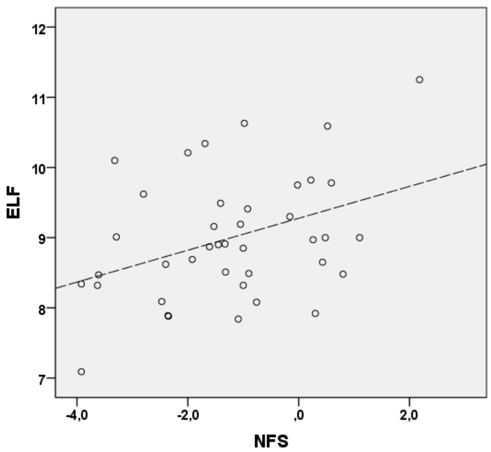
| | HSI | WISP2 | PTX3 | FIB-4 | APRI | NFS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ELF | 0,153 | -0,050 | 0,109 | **0,384*** | 0,159 | **0,383*** |
| HSI | | -0,030 | 0,219 | -0,249 | -0,214 | **0,380*** |
| WISP2 | | | -0,021 | **0,305**** | **0,369**** | 0,094 |
| PTX3 | | | | 0,048 | 0,205 | 0,070 |
| FIB-4 | | | | | **0,612**** | **0,661**** |
| APRI | | | | | | **0,275*** |

*p<0.05, **p<0.01

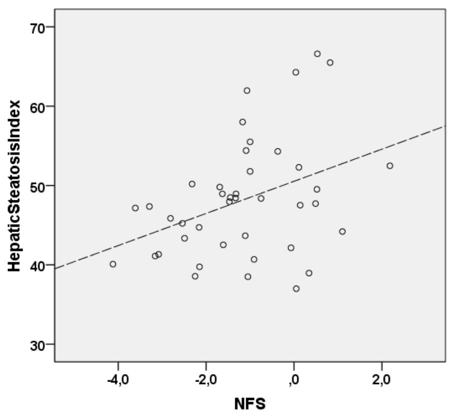
Анализът установява, че ELF корелира слабо и правопропорционално с FIB-4 и NFS (p<0.05). WISP2 корелира правопропорционално и умерено по сила с FIB-4 и APRI (p<0.001). FIB-4 корелира умерено и правопропорционално с APRI и NFS (p<0.001). APRI корелира слабо с NFS (p<0.05), както и HSI с NFS (p<0.05)

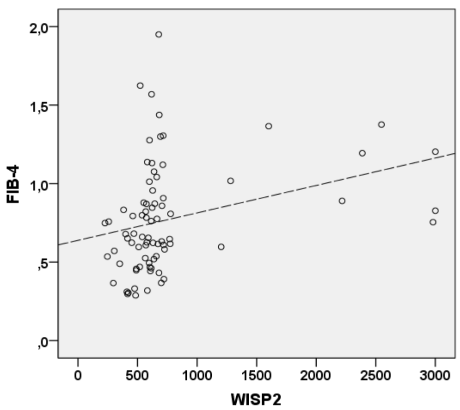
Графично представяне – корелограми на най-значимите резултатите от проведения анализ:



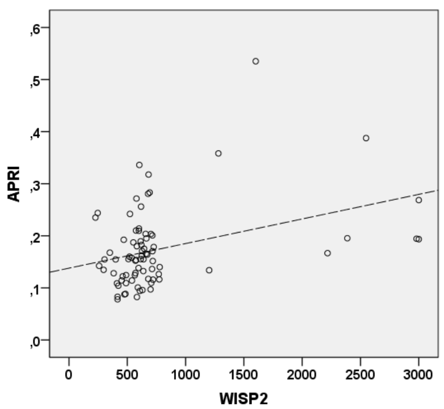




**Фиг. 7.** Корелограма между FIB-4 и ELF **Фиг. 8.** Корелограма между NFS и ELF



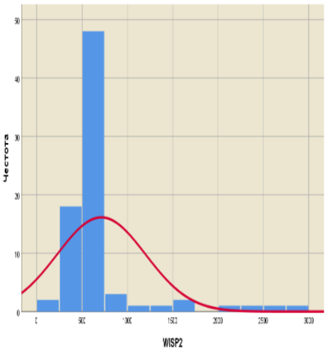




**Фиг. 9.** Корелограма между NFS и HSI **Фиг. 10.** Корелограма между WISP2 и FIB-4

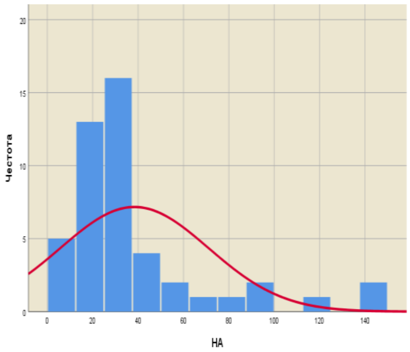



**Фиг. 11.** Корелограма между WISP2 и APRI

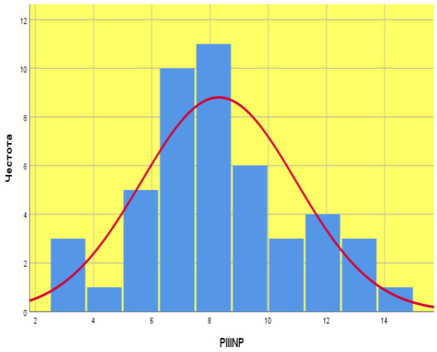
Изследване за предиктивната стойност на показателите WISP2, PTX3, ELF, HA, PIIINP TIMP-1, FIB-4, APRI и NFS за предиабет, ИР и МС. За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ. От изследваните количествени показатели нормално разпределение имаше ELF и част от неговите компоненти (PIIINP, TIMP-1) **(фиг.12)**. За останалите 5 бе приложен метода на ROC кривите за установяване на сигнификантна прагова стойност **(фиг. 13).**



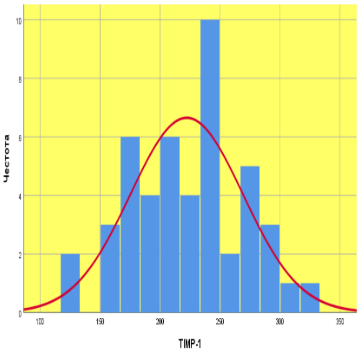

а



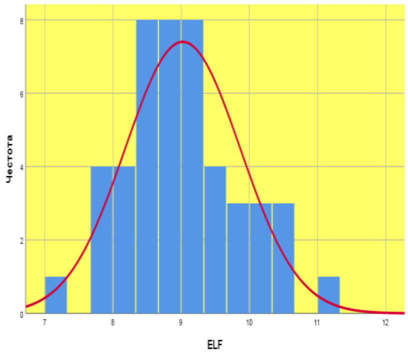

б



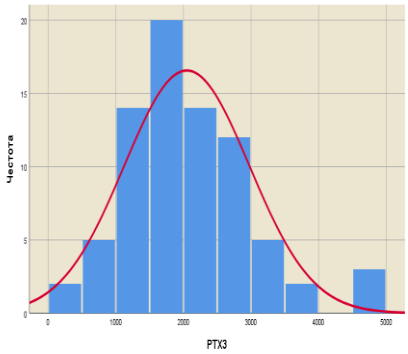

в



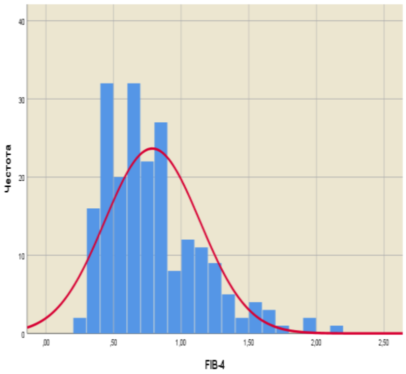

г



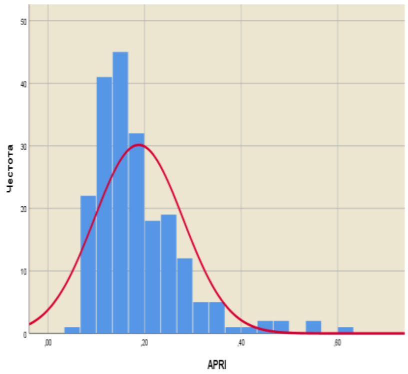

д




е

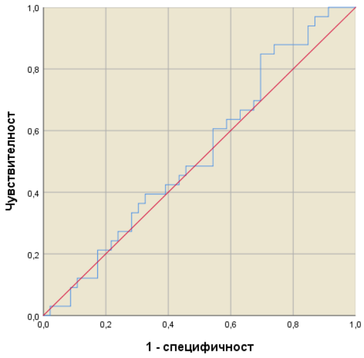



ж

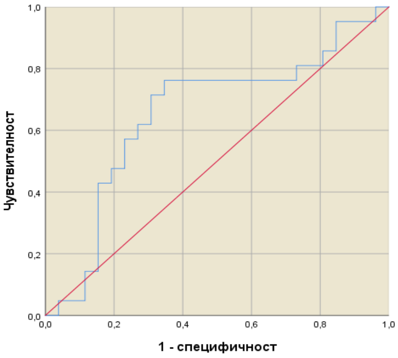



з

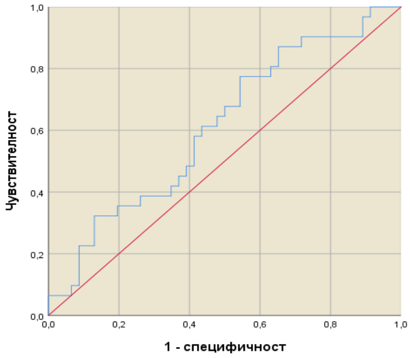
**Фиг. 12.** Честотно разпределение на изследвания контингент по WISP2, p<0,001 (а); HA, p<0,001 (б); PIIINP, p=0,200 (в), TIMP-1, p=0,200 (г); ELF, p=0,200 (д); PTX3, p<0,001 (е); FIB-4, p<0,001 (ж); APRI, p<0,001 (з).



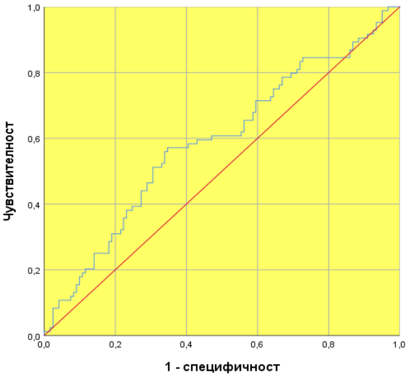

а



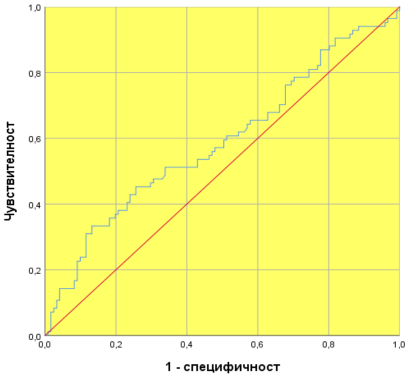

б




в




г




д

Фиг. 13. ROC крива на:

(а) WISP2 (AUC 0,530, p=0,655),

(б) HA ( AUC 0,654, p=0,072)

(в) PTX3 (AUC 0,613, p=0,094)

(г) FIB-4 (AUC 0,589, p=0,030)

(д) APRI ( AUC 0,589, p=0,031) за определяне на праговите им стойности при отграничаването на пациенти с и без предиабет.

Прагови стойности бяха установени за два от тях – FIB-4 и APRI. При така установените прагови стойности (**≥ 0,57 за FIB-4 и ≥ 0,18 за APRI**), стойностите на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет имат сравнително невисоки, но приемливи проценти **(табл. 24).**

**Табл. 24.** Прагови величини на FIB-4, APRI и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет

| **Показател** | **Прагова величина** | **Чувствителност (%)** | **Специфичност (%)** | **Положителна предиктивна стойност (%)** | **Отрицателна предиктивна стойност (%)** | **Прецизност (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FIB-4 | ≥ 0,57 | 79 | 33 | 45 | 69 | 52 |
| APRI | ≥ 0,18 | 51 | 63 | 49 | 65 | 58 |

Бинарната логистична регресия даде следните резултати **табл.25**:

**Таблица 25**: Отношение на рисковете и 95% ДИ на изследваните предиктори за възникване на въглехидратни нарушения

| **Показател** | **Сравнение** | **Индивидуално** | | | | **Групово** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | OR | 95% CI | | p | OR | 95% CI | | p |
| | | | Долна граница | Горна граница | | | Долна граница | Горна граница | |
| FIB-4 | ≥ 0,57 / < 0,57 | 1,811 | 0,951 | 3,449 | 0,071 | | | | |
| APRI | ≥ 0,18 / < 0,18 | 1,771 | 1,007 | 3,116 | **0,047** | 1,545 | 0,830 | 2,878 | 0,170 |

При имащите **APRI ≥ 0,57** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на предиабет е **77% по-висок** (p=0,047). Останалите показатели участващи в анализа не показаха предиктивна стойност по отношение на риска от предиабет, МС и ИР.

## 2.2. Изследване на Фетуин А, FGF 21, AGF и SHBG

Проведеният корелационен анализ за наличието на зависимост между изследваните хепатокини **FGF 21, AGF, SHBG и Фетуин А** и антропометричните показатели (възраст, ИТМ, талия, ханш, мастна тъкан %, WHR, WSR и VAI), установи малък брой корелации представени на **табл.26:**

**Табл. 26.** Коефициенти на корелация между изследваните хепатокини и антропометричните показатели

| Показатели | Фетуин А | FGF21 | AGF | SHBG |
|---|---|---|---|---|
| Възраст | -0,015 | -0,060 | 0,057 | 0,181 |
| ИТМ | -0,146 | 0,126 | -0,136 | -0,217 |
| Талия | -0,023 | 0,143 | 0,087 | **-0,285*** |
| Ханш | -0,154 | -0,028 | -0,194 | -0,042 |
| WHR | 0,037 | 0,190 | **0,255*** | **-0,245*** |
| WSR | -0,043 | **0,259*** | -0,013 | -0,212 |
| VAI | 0,030 | **0,421***** | 0,020 | 0,021 |
| Мазнини % | -0,248 | -0,010 | -0,322 | 0,032 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Анализът показа, че FGF21 корелира слабо и правопропорционално с WSR и силно с VAI. AGF корелира слабо и правопропорционално с WHR. SHBG корелира обратнопропорционално и слабо с обиколката на талията и с WHR.

Най-много корелации се установиха между **FGF21** и показателите включени в **табл. 27**

**Табл. 27.** Коефициенти на корелация между изследваните хепатокини и ТС, ТГ, HDL, LDL, VLDL, АСТ, АЛТ, ГГТ, КЗ и инсулина от 0 мин, 60 мин и 120 мин.

| Показатели | Фетуин А | FGF21 | AGF | SHBG |
|---|---|---|---|---|
| ОХ | 0,194 | 0,139 | 0,072 | 0,195 |
| HDL | -0,090 | -0,216 | 0,015 | 0,137 |
| LDL | 0,137 | 0,118 | 0,093 | 0,140 |
| VLDL | 0,098 | **0,384**** | 0,173 | -0,046 |
| ТГ | 0,098 | **0,352**** | 0,091 | 0,094 |
| АСТ | 0,136 | 0,184 | 0,166 | 0,198 |
| АЛТ | 0,063 | **0,250*** | -0,046 | 0,132 |
| ГГТ | -0,224 | **0,378**** | -0,009 | -0,020 |
| КЗ 0 | -0,159 | **0,258*** | -0,041 | 0,027 |
| КЗ 60 | -0,010 | **0,342**** | -0,032 | 0,050 |
| КЗ 120 | -0,105 | **0,379***** | -0,020 | 0,085 |
| Инсулин 0 | -0,015 | 0,178 | 0,183 | -0,065 |
| Инсулин 60 | 0,013 | -0,048 | 0,032 | **-0,225*** |
| Инсулин 120 | 0,023 | 0,219 | -0,042 | -0,058 |

*** - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001**

Анализът показа умерена по сила и правопропорционална зависимост на **FGF21** с показателите VLDL, ТГ, ГГТ, КЗ на 60 мин. и КЗ на 120 мин. от ОГТТ и наличие на слаба и еднопосочна зависимост с АЛТ и КЗ на 0 мин. От останалите хепатокини единствено **SHBG** корелира обратнопропорционално и слабо с инсулина на 60 мин. от ОГТТ.

Сравнителният анализ между групите със затлъстяване без предиабет и затлъстяване с предиабет по изследваните хепатокини **FGF 21, AGF, SHBG и Фетуин А** е представен на **табл. 28.**

**Табл. 28.** Сравнителен анализ на групите без и с предиабет по изследваните хепатокини

| Хепатокини | Без предиабет n=46 | | С предиабет n=36 | | P |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Фетуин А | 717,03 | 181,84 | 661,43 | 148,26 | 0,141 |
| FGF21 | 360,60 | 298,09 | 450,98 | 264,82 | **0,010** |
| AGF | 8,55 | 1,70 | 8,15 | 1,69 | 0,293 |
| SHBG | 49,85 | 28,12 | 43,89 | 19,48 | 0,604 |

Анализът установи сигнификантна разлика само при **FGF21**. Със значимо по-висока средна стойност беше групата с предиабет (p=0,010).

По отношение на МС се установиха подобни резултати представени на **табл. 29.**

**Табл.29**: Сравнителен анализ на пациенти без и с МС по изследваните хепатокини

| Хепатокини | Без метаболитен синдром n=24 | | С метаболитен синдром n=58 | | | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | | $\overline{X}$ | SD | |
| Фетуин А | 700,28 | 214,32 | 58 | 689,45 | 148,75 | 0,823 |
| FGF21 | 261,33 | 132,83 | 58 | 457,78 | 312,24 | **<0,001** |
| AGF | 8,53 | 1,95 | 58 | 8,31 | 1,59 | 0,594 |
| SHBG | 56,35 | 32,45 | 57 | 43,35 | 19,69 | 0,209 |

Анализът показа сигнификантна разлика между пациентите с и без МС отново само при **FGF21**, който със значимо по-висока средна стойност беше в групата с МС (p<0.001).

Артериалната хипертония не оказа влияние върху изследавните хепатокини (**табл. 30).**

**Табл. 30**: Сравнителен анализ на пациенти без и с артериална хипертония по изследваните хепатокини

| Хепатокини | Без АХ n=21 | | С АХ n=61 | | P |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Фетуин А | 728,96 | 169,73 | 680,11 | 168,64 | 0,256 |
| FGF21 | 403,73 | 365,50 | 399,09 | 256,45 | 0,398 |
| AGF | 8,71 | 1,81 | 8,26 | 1,65 | 0,294 |
| SHBG | 50,31 | 29,95 | 46,11 | 22,76 | 0,901 |

По отношение на дислипидемията сигнификантна разлика се установи единствено отново при **FGF21 (табл.31)**.

**Табл. 31**: Сравнителен анализ на пациенти без и с дислипидемия по изследваните хепатокини

| Хепатокини | Без дислипидемия n=37 | | С дислипидемия n=45 | | P |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Фетуин А | 687,70 | 198,03 | 696,66 | 143,52 | 0,813 |
| FGF21 | 314,39 | 224,54 | 470,90 | 312,82 | **0,004** |
| AGF | 8,26 | 1,67 | 8,48 | 1,73 | 0,565 |
| SHBG | 47,34 | 26,46 | 47,08 | 23,49 | 0,575 |

Анализът показа значимо по-висока средна стойност на **FGF21** в групата с дислипидемия (p=0,004).

По отношение на инсулиновата резистентност, сигнификантна разлика се установи отново само при **FGF 21 (табл.32).**

**Табл. 32** Сравнителен анализ на пациенти без и с инсулинова резистентност по изследваните хепатокини

| **Хепатокини** | **Без ИР n=22** | | **С ИР n=60** | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| Фетуин А | 701,56 | 195,90 | 685,90 | 159,17 | 0,713 |
| FGF21 | 303,46 | 215,78 | 439,75 | 302,37 | **0,020** |
| AGF | 8,07 | 1,46 | 8,48 | 1,79 | 0,337 |
| SHBG | 55,06 | 30,13 | 44,30 | 22,28 | 0,158 |

Анализът показа значимо по-висока средна стойност на **FGF21** в групата с инсулинова резистентност (p=0,020).

Корелацията между хепатокинитите Фетуин А, FGF21, AGF и SHBG и индексите за инсулинова чувствителност и фиброзните скорове е представена на **табл. 33.**

**Табл. 33**: Коефициенти на корелация между изследваните хепатокини и индексите Quicky, Stumwoll, Bennett и фиброзните скорове ELF, FIB4, NFS и APRI

| **Показатели** | **Фетуин А** | **FGF21** | **AGF** | **SHBG** |
|---|---|---|---|---|
| Quicky | 0,055 | **-0,263*** | -0,176 | 0,090 |
| ISIstumvoll | 0,023 | **-0,253*** | 0,050 | 0,087 |
| Bennett | 0,078 | **-0,293**** | -0,150 | 0,097 |
| ELF | 0,209 | -0,047 | -0,249 | 0,154 |
| FIB4 | -0,076 | -0,026 | 0,206 | 0,175 |
| NFS | -0,040 | 0,003 | 0,101 | -0,149 |
| APRI | -0,060 | 0,094 | 0,147 | 0,117 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

От четирите изследвани хепатокини единствено **FGF21** корелира обратнопропорционално и слабо с индексите Quicky, ISIstumvoll и Bennett.

Между изследваните хепатокини и **показателите за микро- и макроангиопатия** (индекса глезен мишница (ABI), интима медиа дебелина (IMT), индекса за периферна невропатия (NDS), вибрационния праг (VPT) и риска за автономна невропатия (ANR), както и HSI бяха установени малък брой слаби корелации **(табл.34).**

**Табл. 34**: Коефициенти на корелация между изследваните хепатокини и HSI, ABI, IMT, NDS, VPT и ANR

| Показатели | Фетуин А | FGF21 | AGF | SHBG |
|---|---|---|---|---|
| HSI | -0,175 | 0,161 | **-0,232*** | -0,195 |
| ABI | **0,221*** | 0,034 | -0,020 | 0,147 |
| IMT | -0,014 | 0,054 | 0,020 | 0,101 |
| NDS | -0,076 | -0,028 | -0,045 | 0,116 |
| VPT | 0,086 | -0,052 | 0,195 | -0,085 |
| ANR | 0,095 | 0,022 | -0,093 | -0,173 |

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Корелации се наблюдават само при Фетуин А и ABI – слаба и еднопосочна и между AGF и HSI - обратнопропорционална и слаба.

Интересно бе да проверим каква е връзката между изследавните биомаркери и тяхното влияние помежду им. Резултатите са представени на **табл. 35**.

**Табл. 35.** Коефициенти на корелация между изследваните биомаркери

| Показатели | FGF21 | AGF | SHBG | WISP2 | PTX3 |
|---|---|---|---|---|---|
| Фетуин А | -0,049 | 0,126 | 0,101 | **0,439***** | -0,199 |
| FGF21 | | 0,059 | 0,046 | -0,091 | 0,061 |
| AGF | | | 0,048 | 0,133 | 0,056 |
| SHBG | | | | 0,180 | 0,109 |
| WISP2 | | | | | -0,181 |

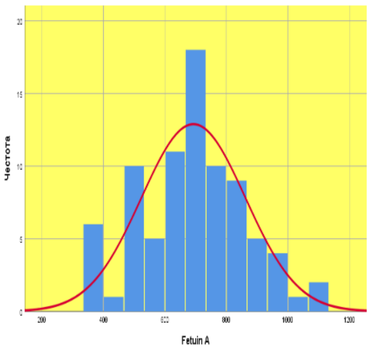
* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Резултатите показаха, че между включените в изследването биомаркери зависимост се наблюдаваше само между **Фетуин А и WISP2**. Корелацията беше умерена по сила и правопропорционална ($p<0,001$).

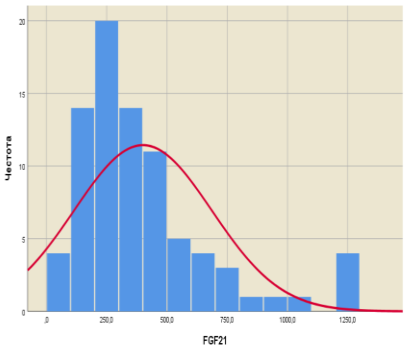
### Предиктивна стойност на Фетуин А, FGF 21, AGF и SHBG за риск от предиабет, МС и ИР

#### Риск от предиабет

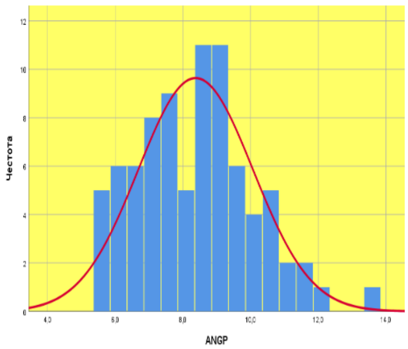
За целта беше приложен бинарен логистичен регресионен анализ. Поради това, че от изследваните биомаркери само Фетуин А и AGF имат нормално разпределение **(фиг.14)** за останалите два бе приложен метода на ROC кривите за установяване на сигнификантна прагова стойност **(фиг.15).**



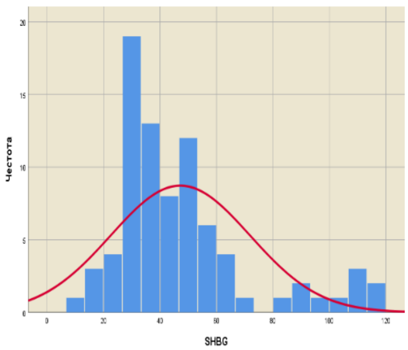

а




б

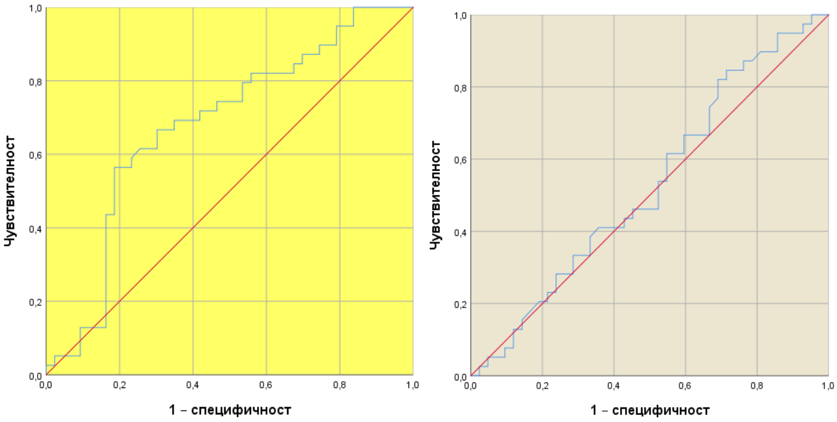



в




г

**Фиг.14**: Честотно разпределение на изследвания контингент по Фетуин А, p=0,200 (а); FGF21, p<0,001 (б); AGF, p=0,200 (в); SHBG, p<0,001 (г)




а б

**Фиг.15**. ROC криви на (а) FGF21 (AUC 0,679, p=0,005), и (б) SHBG (AUC 0,529, p=0,653) за определяне на праговите им стойности при отграничаването на пациенти с и без предиабет

За **FGF21** такава стойност бе установена **(≥ 320 pg/ml),** докато за SHBG такава нямаше. Стойностите на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет по FGF21 имаха сравнително добри величини **(табл. 36).**

**Табл. 36.** Прагова величина на FGF21 и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет

| Показател | Прагова величина | Чувствителност (%) | Специфичност (%) | Положителна предиктивна стойност (%) | Отрицателна предиктивна стойност (%) | Прецизност (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FGF21(pg/ml) | ≥ 320 | 69 | 65 | 64 | 70 | 67 |

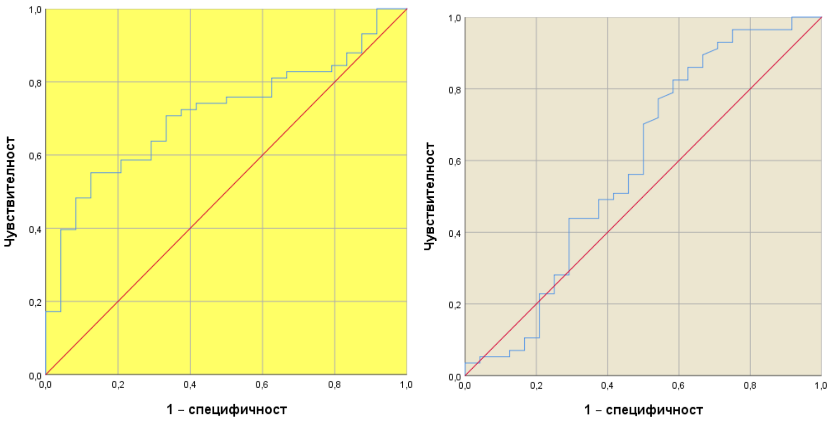
Бинарната логистична регресия показа наличие на сигнификантно влияние единствено на **FGF21 – при имащите стойности ≥ 320 pg/ml** рискът за възникване на предиабет е **4,2 пъти по-висок** спрямо този на пациентите с по-ниски стойности **(табл.37).**

**Табл. 37.** Отношение на рисковете и 95% ДИ на изследваните предиктори за възникване на предиабет

| Показател | Сравнение | OR | 95% CI Долна граница | 95% CI Горна граница | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Fetuin A | Увеличение с 1 | 0,998 | 0,995 | 1,001 | 0,154 |
| FGF21 | ≥ 320 / < 320 | 4,200 | 1,665 | 10,592 | **0,002** |
| AGF | Увеличение с 1 | 0,834 | 0,640 | 1,088 | 0,181 |

**Риск за МС**

Както и при въглехидратните нарушения единствено при **FGF21** бе намерена сигнификантна прагова стойност (**в случая ≥ 270 pg/ml**), при която се получават много добри величини на критериите за валидизация **(фиг. 16 и табл. 38).**




а б

**Фиг. 16**. ROC криви на (а) FGF21 (AUC 0,713, p=0,003), и (б) SHBG (AUC 0,589, p=0,209) за определяне на праговите им стойности при отграничаването на пациенти с и без МС

**Табл. 38.** Прагова величина на FGF21 и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без МС

| **Показател** | **Прагова величина** | **Чувствителност (%)** | **Специфичност (%)** | **Положителна предиктивна стойност (%)** | **Отрицателна предиктивна стойност (%)** | **Прецизност (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FGF21(pg/ml) | ≥ 270 | 71 | 63 | 82 | 47 | 68 |

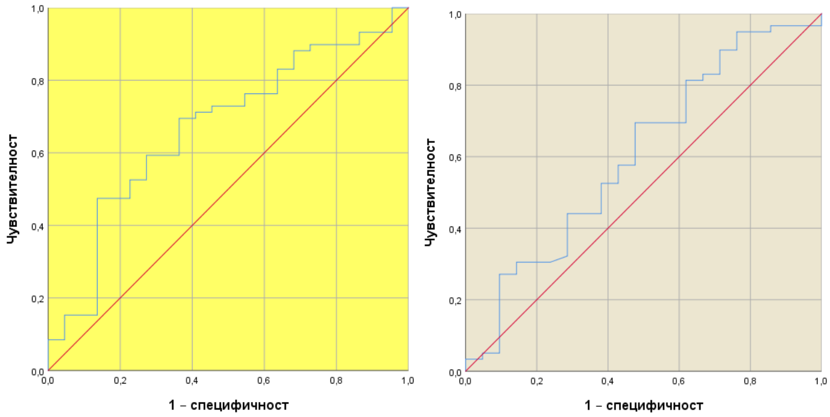
Бинарният логистичен регресионен анализ показа влияние единствено на **FGF21** – при имащите **стойности ≥ 270 pg/ml** рискът за възникване на **МС** е **4 пъти по-висок** спрямо този на пациентите с по-ниски стойности **(табл. 39).**

**Табл. 39.** Отношение на рисковете и 95% ДИ на изследваните хепатокини за възникване на МС

| **Показател** | **Сравнение** | OR | 95% CI | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Долна граница | Горна граница | |
| Фетуин А | Увеличение с 1 | 1,000 | 0,997 | 1,002 | 0,791 |
| FGF21 | ≥ 270 / < 270 | 4,020 | 1,477 | 10,941 | **0,006** |
| AGF | Увеличение с 1 | 0,926 | 0,699 | 1,226 | 0,590 |

### Риск за ИР

И в този случай единствено при **FGF21** бе намерена сигнификантна прагова стойност **(≥ 260 pg/ml)**, при която се получиха много добри величини на критериите за валидизация **(фиг. 17 и табл. 40).**




а б

**Фиг. 17**. ROC криви на (а) FGF21 (AUC 0,669, p=0,20 и (б) SHBG ( AUC 0,604, p=0,158) за определяне на праговите им стойности при отграничаването на пациенти с и без ИР

**Табл. 40.** Прагова величина на FGF21 и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без ИР

| **Показател** | **Прагова величина** | **Чувствителност (%)** | **Специфичност (%)** | **Положителна предиктивна стойност (%)** | **Отрицателна предиктивна стойност (%)** | **Прецизност (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FGF21(pg/ml) | ≥ 260 | 73 | 55 | 81 | 43 | 68 |

Бинарният логистичен регресионен анализ установи влияние единствено на **FGF21** – при имащите **стойности ≥ 260 pg/ml** рискът за възникване на ИР е **3,2 пъти по-висок** спрямо този на пациентите с по-ниски стойности **(табл. 41).**

**Табл. 41**. Отношение на рисковете и 95% ДИ на изследваните предиктори за възникване на ИР

| **Показател** | **Сравнение** | OR | 95% CI Долна граница | 95% CI Горна граница | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Fetuin A | Увеличение с 1 | 0,999 | 0,997 | 1,002 | 0,709 |
| FGF21 | ≥ 260 / < 260 | 3,225 | 1,167 | 8,914 | **0,024** |
| AGF | Увеличение с 1 | 1,159 | 0,859 | 1,565 | 0,334 |

## 2.3. Генетични полиморфизми PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K при пациенти с НАСБ, предиабет и МС и връзката им с изследваните биохимични показатели, хепатокини и фиброзни скорове

### 2.3.1. PNPLA3 I148M

Честатното разпределение на нормалните хомозиготи (CC), хомозиготните (GG) и хетерозиготните (CG) полиморфизми на I148M вариант в PNPLA3 ген е представено на **табл**. **42**.

**Табл. 42**. Разпределение на норми и варианти (в хомо- и хетерозиготно състояние) на I148M полиморфизма в PNPLA3 при всички пациенти с НАСБ

| PNPLA3 | n | Относителен дял (%) | Sp |
|---|---|---|---|
| CC | 121 | 58,2 | 3,4 |
| CG | 77 | 37,0 | 3,2 |
| GG | 10 | 4,8 | 1,4 |
| **Общо** | 208 | 100,0 | |

При PNPLA3 с най-голям относителен дял (55,5%) бяха нормалните хомозиготи (CC), следвани от хетерозиготните варианти (CG) 35,3%, а най-малко (4,6%) бяха хомозиготните варианти (GG).

Анализ на връзката между генетичните промени на PNPLA3 и изследваните количествени показатели са показани на **табл. 43**.

**Табл. 43.** Анализ на връзката между норми и варианти на PNPLA3 и изследваните количествени показатели

| Показатели | PNPLA3 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CC n=121 | | CG n=77 | | GG n=10 | |
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD |
| WISP2 | 715,54[a] | 588,94 | 713,49[a] | 320,10 | 666,66 | 40,38 |
| HA | 35,15[a] | 30,42 | 36,05[a] | 28,23 | 75,36 | 95,07 |
| PIIINP | 8,59[a] | 2,96 | 7,77[a] | 2,41 | 8,08 | 1,72 |
| TIMP-1 | 213,87[a] | 44,11 | 237,49[a] | 44,67 | 287,10 | 52,33 |
| ELF | 9,01[a] | 0,91 | 8,94[a] | 0,72 | 9,22 | 1,94 |
| PTX3 | 2122,31[a] | 935,48 | 1889,19[a] | 793,17 | 2600,56 | 1950,39 |
| КЗ 0 | **5,64[a]** | 1,92 | **6,14[b]** | 1,53 | **6,54[b]** | 2,20 |
| КЗ 60 | **8,52[a]** | 2,58 | **9,80[bc]** | 2,74 | **9,98[ac]** | 3,03 |
| КЗ 120 | **6,23[a]** | 2,10 | **7,12[bc]** | 2,49 | **7,43[ac]** | 2,29 |
| Инсулин 0 | 19,43[a] | 23,22 | 17,71[a] | 14,13 | 21,09[a] | 9,96 |
| Инсулин 60 | 116,47[a] | 95,12 | 119,01[a] | 71,23 | 133,64[a] | 69,30 |
| Инсулин 120 | 77,41[a] | 107,49 | 77,72[a] | 63,22 | 102,09[a] | 83,16 |
| HOMA-IR | 4,85[a] | 6,60 | 4,78[a] | 4,30 | 5,49[a] | 2,55 |
| Bennett | 1,24[a] | 0,34 | 1,18[a] | 0,33 | 1,03[a] | 0,15 |
| QUICKI | 2,34[a] | 5,48 | 1,93[a] | 1,53 | 1,31[a] | 0,28 |
| ISIstumvoll | 0,03[a] | 0,07 | 0,03[a] | 0,04 | 0,01[a] | 0,06 |
| HIS | 49,39[a] | 7,60 | 48,77[a] | 7,65 | 50,63[a] | 7,33 |
| ABI | 1,10[a] | 0,15 | 1,10[a] | 0,14 | 1,20[a] | 0,16 |
| IMT | 0,61[a] | 0,11 | 0,65[a] | 0,10 | 0,67[a] | 0,12 |
| NDS | 1,48[a] | 1,81 | 2,00[a] | 2,49 | 0,90[a] | 1,66 |
| VPT | **11,94[a]** | 4,82 | **13,03[bc]** | 5,28 | **10,85[ac]** | 2,93 |
| ANR | 32,92 | 12,48 | 35,12 | 13,22 | 33,40 | 9,30 |

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p<0,05$)**

Анализът показа, че при КЗ на 0 мин., 60 мин. и КЗ на 120 мин. се наблюдаваше сигнификантна разлика между относителните дялове на нормалните CC хомозиготи, CG хетерозиготите и GG хомозиготите по патологичния ген ($p<0,05$). При КЗ на 0 мин. патологичните промени имаха значимо по-висока средна стойност на показателя спрямо тази на нормалните хомозиготи ($p<0,01$). При КЗ на 60 мин. и КЗ на 120 мин. хетерозиготните варианти бяха със статистически достоверно по-високи стойности на показателя спрямо тези на нормалните хомозиготи, но не и хомозиготните варианти, които не се различаваха от тези на останалите две групи.

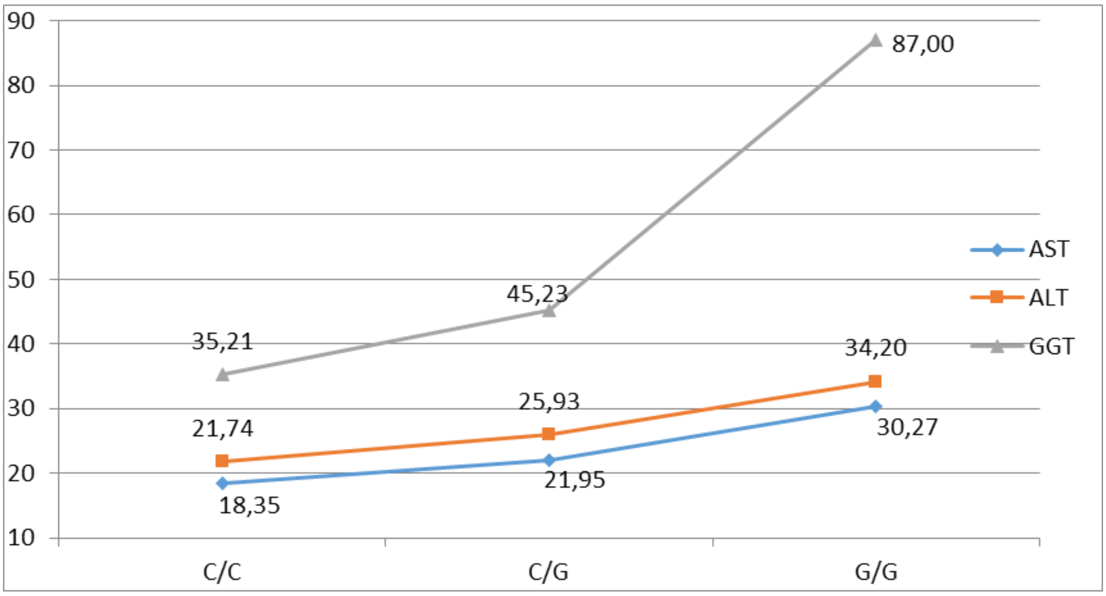
Анализ на връзката между генетичните промени на PNPLA3 и ОХ, HDL, LDL, ТГ, VLDL, АСТ, АЛТ и ГГТ е показан на **табл. 44.**

**Табл. 44.** Анализ на връзката между PNPLA3 в норма и вариант и показателите ОХ, HDL, LDL, ТГ, VLDL, АСТ, АЛТ и ГГТ

| **Показатели** | **PNPLA3** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CC | | | CG | | | GG | | |
| | n | $\overline{X}$ | SD | n | $\overline{X}$ | SD | n | $\overline{X}$ | SD |
| ОХ | 121 | $5{,}19^{a}$ | 1,03 | 77 | $5{,}29^{a}$ | 0,99 | 10 | $5{,}26^{a}$ | 0,85 |
| HDL | 120 | $1{,}25^{a}$ | 0,30 | 77 | $1{,}22^{a}$ | 0,31 | 10 | $1{,}12^{a}$ | 0,21 |
| LDL | 115 | $3{,}19^{a}$ | 0,92 | 73 | $3{,}28^{a}$ | 0,92 | 10 | $2{,}94^{a}$ | 0,64 |
| VLDL | 111 | $0{,}70^{a}$ | 0,32 | 72 | $0{,}74^{a}$ | 0,26 | 10 | $0{,}93^{a}$ | 0,46 |
| ТГ | 120 | $1{,}63^{a}$ | 0,91 | 77 | $1{,}83^{a}$ | 0,93 | 10 | $2{,}17^{a}$ | 1,15 |
| АСТ | 119 | $18{,}35^{a}$ | 6,18 | 76 | $21{,}95^{b}$ | 10,93 | 10 | $30{,}27^{c}$ | 14,47 |
| АЛТ | 121 | $21{,}74^{a}$ | 12,08 | 76 | $25{,}93^{ac}$ | 18,77 | 10 | $34{,}20^{bc}$ | 15,63 |
| ГГТ | 117 | $35{,}21^{a}$ | 38,88 | 74 | $45{,}23^{a}$ | 60,48 | 8 | $87{,}00^{b}$ | 86,53 |

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика,а различните – наличие на такава ($p<0,05$)

Анализът показа, че единствено при АСТ, АЛТ и ГГТ се наблюдава сигнификантна разлика между средните стойности на групите с нормални хомозиготи (CC), хетерозиготи (CG) и хомозиготи (GG) по патологичния алел. При АСТ групите с хомозиготни и хетерозиготни варианти имаха значимо по-висока средна стойност на показателя спрямо тази на нормалните хомозиготи, като най-високата е при GG, която е сигнификантно по-висока и от тази при CG. Хомозиготите по патологичния алел бяха със статистически достоверно по-висока средна стойност на АЛТ спрямо тези на нормалните хомозиготи, но не и от тази на групата с CG хетерозиготи, която не се различаваше от тези на останалите две групи. При ГГТ статистически достоверно по-висока средна стойност се наблюдаваше в групата на хомозиготите по патологичния алел спрямо останалите две групи, които не се различаваха статистически по този показател **(фиг.18).**




**Фиг. 18**. Анализ на връзката между PNPLA3 и АСТ, АЛТ и ГГТ ($p<0.05$)

Сравнителният анализ на пациентите с норми и варианти на **PNPLA3** по WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3, HSI, FIB-4, APRI, HOMA-IR е показан на **табл.45.**

**Табл. 45.** Сравнителен анализ на пациентите с норми и варианти на PNPLA3 по WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3, HSI, FIB-4, APRI, HOMA-IR

| **Показател** | **PNPLA3 CC** | | | **PNPLA3 CG + GG** | | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | $\overline{X}$ | SD | n | $\overline{X}$ | SD | |
| WISP2 | 46 | 715,54 | 588,94 | 33 | 709,23 | 305,20 | 0,078 |
| HA | 24 | 35,15 | 30,42 | 18 | 40,42 | 37,37 | 0,722 |
| PIIINP | 24 | 8,59 | 2,96 | 18 | 7,81 | 2,30 | 0,559 |
| TIMP-1 | 24 | 213,87 | 44,11 | 18 | 243,01 | 46,68 | **0,045** |
| ELF | 24 | 9,01 | 0,91 | 18 | 8,97 | 0,83 | 0,829 |
| PTX3 | 44 | 2122,31 | 935,48 | 33 | 1953,86 | 922,51 | 0,550 |
| HIS | 117 | 49,39 | 7,60 | 86 | 48,99 | 7,59 | 0,636 |
| FIB-4 | 117 | 0,72 | 0,31 | 85 | 0,88 | 0,40 | **0,002** |
| APRI | 117 | 0,17 | 0,07 | 85 | 0,21 | 0,11 | **0,003** |
| HOMA-IR | 118 | 4,85 | 6,60 | 83 | 4,86 | 4,14 | 0,085 |

Анализът показа сигнификантна разлика при показателите **TIMP-1, FIB-4 и APRI**. Значимо по-високи стойности се установиха при пациентите с хомозиготни и хетерозиготни варианти на PNPLA3 ген ($p<0,05$).

### 2.3.2. TM6SF2 E167K

Честотното разпределение на нормалните хомозиготи (CC) и хетерозиготните полиморфизми (CT) на E167K вариант в TM6SF2 ген е представено на **табл. 46**. Хомозиготи по патологичния алел при този ген в иследваните пациенти не бяха открити.

**Табл. 46.** Разпределение на норми в хомозиготно (CC) и варианти в хетерозиготно (CT) състояние на E167K полиморфизъм в TM6SF2 ген при всички изследвани пациенти

| TM6SF2 | n | Относителен дял (%) | Sp |
|---|---|---|---|
| CC | 194 | 89,0 | 2,1 |
| CT | 14 | 11,0 | 1,7 |
| **Общо** | 208 | 100,0 | |

При TM6SF2 с най-голям относителен дял (89%) отново са нормалните хомозиготи CC, следвани от CT хетерозиготните варианти с 11,0%.

Значително по-голям брой показатели със сигнификантни разлики се установи при анализа на връзката между тях и TM6SF2 в норма и вариант **(табл. 47):**

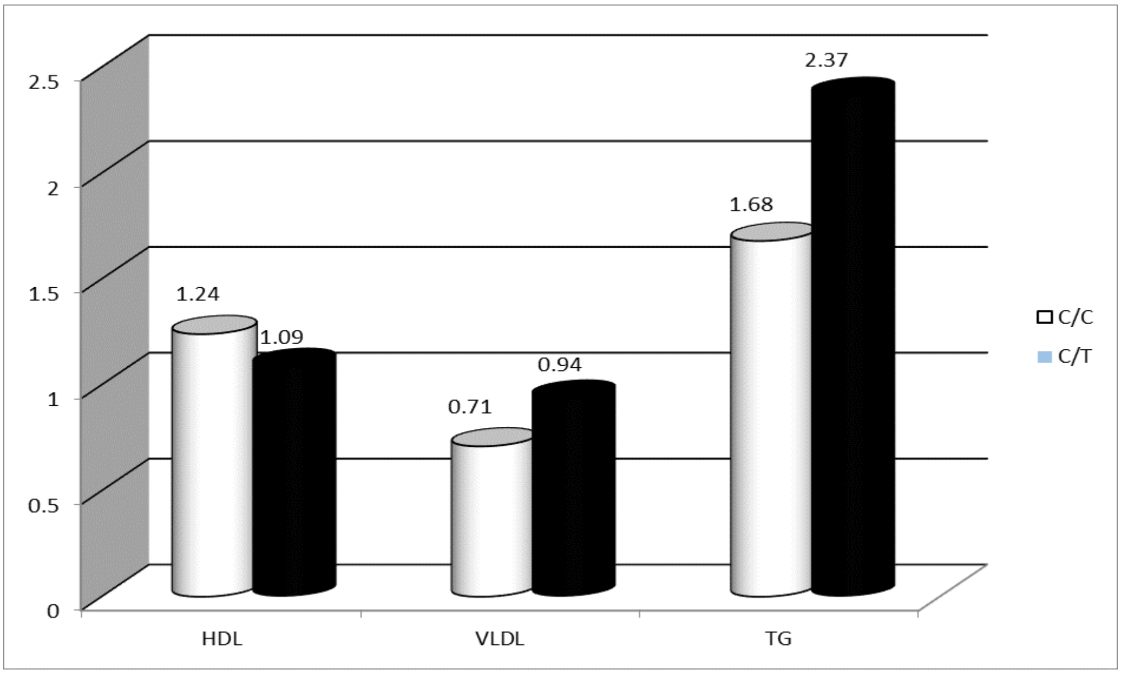
**Табл. 47**. Анализ на връзката между норми (CC) и варианти (CT) на ген TM6SF2 и изследваните количествени показатели

| **Показатели** | **TM6SF2** | | | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| | CC n=194 | | CT n=14 | | |
| | $\overline{X}$ | SD | $\overline{X}$ | SD | |
| WISP2 | 716,14 | 503,03 | 673,58 | 268,71 | - |
| HA | 36,79 | 33,90 | 45,44 | 26,82 | - |
| PIIINP | 8,26 | 2,68 | 8,22 | 3,55 | - |
| TIMP-1 | 226,44 | 44,45 | 225,27 | 87,85 | - |
| ELF | 8,97 | 0,87 | 9,23 | 0,89 | - |
| PTX3 | 2074,75 | 946,68 | 1695,43 | 523,37 | - |
| КЗ 0 | 5,74 | 1,24 | 7,66 | 5,06 | **0,002** |
| КЗ 60 | 8,91 | 2,69 | 10,99 | 2,51 | **0,007** |
| КЗ 120 | 6,46 | 2,24 | 8,64 | 2,09 | **0,001** |
| Инсулин 0 | 18,51 | 20,26 | 24,48 | 10,12 | **0,007** |
| Инсулин 60 | 118,58 | 88,03 | 112,58 | 43,99 | 0,528 |
| Инсулин 120 | 75,86 | 93,65 | 118,48 | 67,27 | **0,001** |
| HOMA-IR | 4,76 | 5,82 | 6,32 | 3,03 | **0,014** |
| Bennett | 1,22 | 0,33 | 0,97 | 0,21 | **0,003** |
| QUICKI | 2,20 | 4,42 | 1,23 | 0,42 | **0,005** |
| ISIstumvoll | 0,03 | 0,06 | 0,01 | 0,04 | **0,004** |
| HSI | 49,02 | 7,54 | 52,36 | 7,99 | 0,138 |
| ABI | 1,11 | 0,15 | 1,04 | 0,16 | 0,114 |
| IMT | 0,63 | 0,10 | 0,62 | 0,17 | 0,838 |
| NDS | 1,61 | 2,12 | 2,17 | 1,80 | 0,174 |
| VPT | 12,32 | 4,99 | 11,93 | 4,43 | 0,813 |
| ANR | 33,52 | 12,47 | 37,38 | 14,69 | 0,456 |

Анализът показа, че групата с CT хетерозиготните варианти имаше значимо по-високи средни стойности при показателите КЗ на 0 мин., КЗ на 60 мин. и КЗ на 120 мин., инсулин на 0 мин. и 120 мин., и HOMA-IR. Групата с CC нормални хомозиготи имаха статистически достоверно по-високи средни стойности при индексите Bennett, QUICKI и ISIstumvoll. При останалите показатели в таблицата разликите или нямаха сигнификантна стойност или броят на случаите с CT хетерозиготни варианти не позволи да се направят достоверни статистически изводи.

По отношение на липидните показатели хетерозиготите по патологичния алел на TM6SF2 имаха значимо по-високи средни стойности при показателите **VLDL и ТГ**.

Групата на нормалните хомозиготи имаше статистически достоверно по-висока средна стойност при HDL. **(Фиг.19)**




**Фиг. 19**. Анализ на връзката между TM6SF2 и HDL, VLDL и ТГ ($p<0.05$)

Сравнителният анализ на пациентите с и без генетични промени на TM6SF2 по WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3, HSI, FIB-4, APRI, HOMA-IR е представен на **табл. 48**

**Табл. 48.** Сравнителен анализ на пациентите с и без генетични промени (ген TM6SF2 норми и варианти) по WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3, FGF 21, Фетуин A, AGF, SHBG HSI, FIB-4, APRI, HOMA-IR.

| **Показател** | **TM6SF2 CC** | | | **TM6SF2 CT** | | | **P** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | $\overline{X}$ | SD | n | $\overline{X}$ | SD | |
| WISP2 | 73 | 716,14 | 503,03 | 6 | 673,58 | 268,71 | - |
| HA | 39 | 36,79 | 33,90 | 3 | 45,44 | 26,82 | - |
| PIIINP | 39 | 8,26 | 2,68 | 3 | 8,22 | 3,55 | - |
| TIMP-1 | 39 | 226,44 | 44,45 | 3 | 225,27 | 87,85 | - |
| ELF | 39 | 8,97 | 0,87 | 3 | 9,23 | 0,89 | - |
| PTX3 | 72 | 2074,75 | 946,68 | 5 | 1695,43 | 523,37 | - |
| HIS | 191 | 49,02 | 7,54 | 12 | 52,36 | 7,99 | 0,138 |
| FIB-4 | 190 | 0,78 | 0,35 | 12 | 0,85 | 0,39 | 0,596 |
| APRI | 190 | 0,18 | 0,09 | 12 | 0,21 | 0,09 | 0,176 |
| HOMA-IR | 189 | 4,76 | 5,82 | 12 | 6,32 | 3,03 | **0,014** |

* - в анализа не участват групите нямащи статистическа представителност

Анализът показа наличие на сигнификантна разлика единствено при индекса HOMA-IR. Значимо по-високи стойности се наблюдаваха при хетерозиготните варианти (p= 0,014).

### 2.3.3. Анализ на връзката между PNPLA3 и TM6SF2 и предиабета, МС, ИР и дислипидемията

Сравнителният анализ между групите със затлъстяване без въглехидратни нарушения и затлъстяване с предиабет по двата гена е показан на **табл. 49.**

**Табл. 49.** Анализ на връзката между норми и варианти на PNPLA3 и TM6SF2 в групите с и без предиабет

| **Ген** | **Алели** | **Честота** | **Без предиабет** | **С предиабет** | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| PNPLA3 | CC | n | 90 | 31 | **<0,001** |
| | | % | 72,0[a] | 37,3[b] | |
| | CG | n | 31 | 46 | |
| | | % | 24,8[a] | 55,4[b] | |
| | GG | n | 4 | 6 | |
| | | % | 3,2[a] | 7,2[a] | |
| TM6SF2 | CC | n | 123 | 71 | **<0,001** |
| | | % | 98,4[a] | 85,5[b] | |
| | CT | n | 2 | 12 | |
| | | % | 1,6[a] | 14,5[b] | |

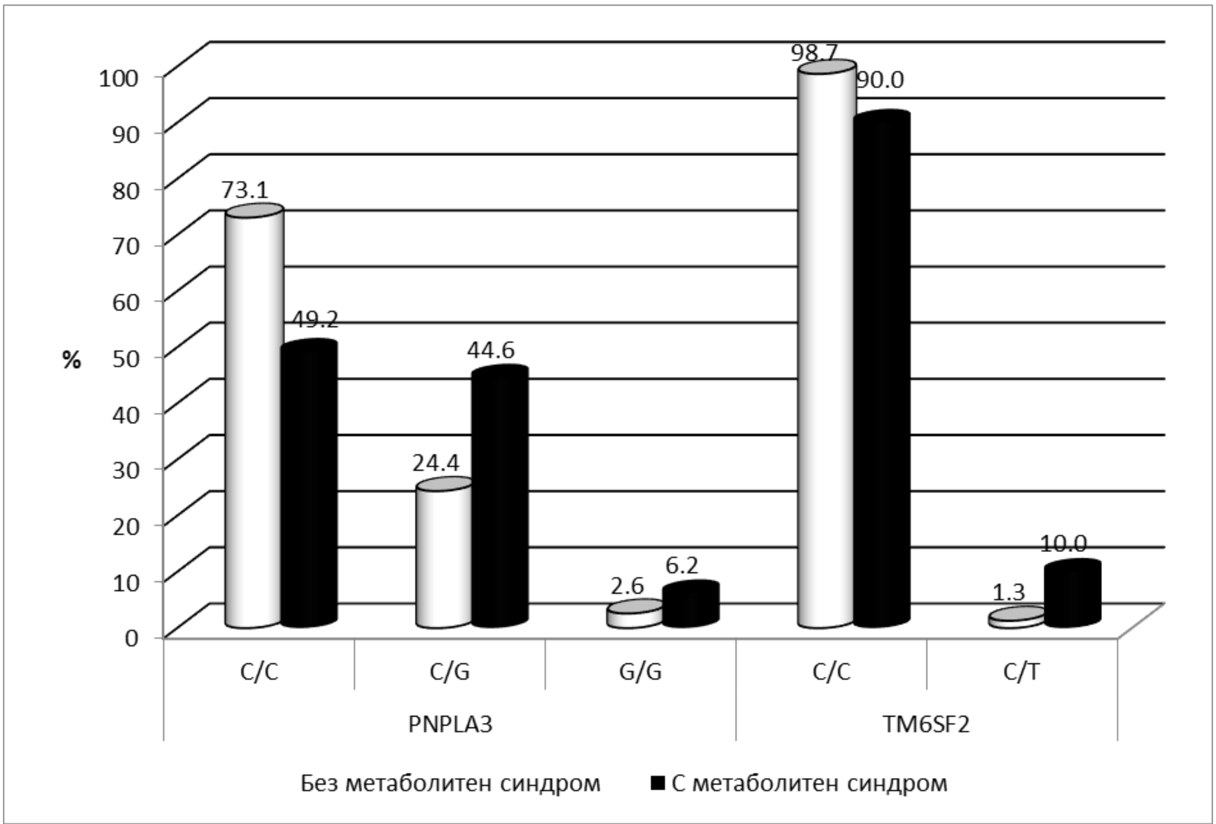
* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (p<0,05)

Анализът показа сигнификантна зависимост между генетичните промени и **предиабета.**

При **PNPLA3**, процентът на хетерозиготните варианти беше значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази без такава статистически достоверно по-висок беше относителният дял на нормалните хомозиготи (p<0,001). При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не бе установена.

При **TM6SF2** процентът на хетерозиготните варианти също беше значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази без предиабет - статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи ($p<0,001$).

Резултатите от анализа на връзката между генетичните промени и **МС** са представени на **Фиг.20.**

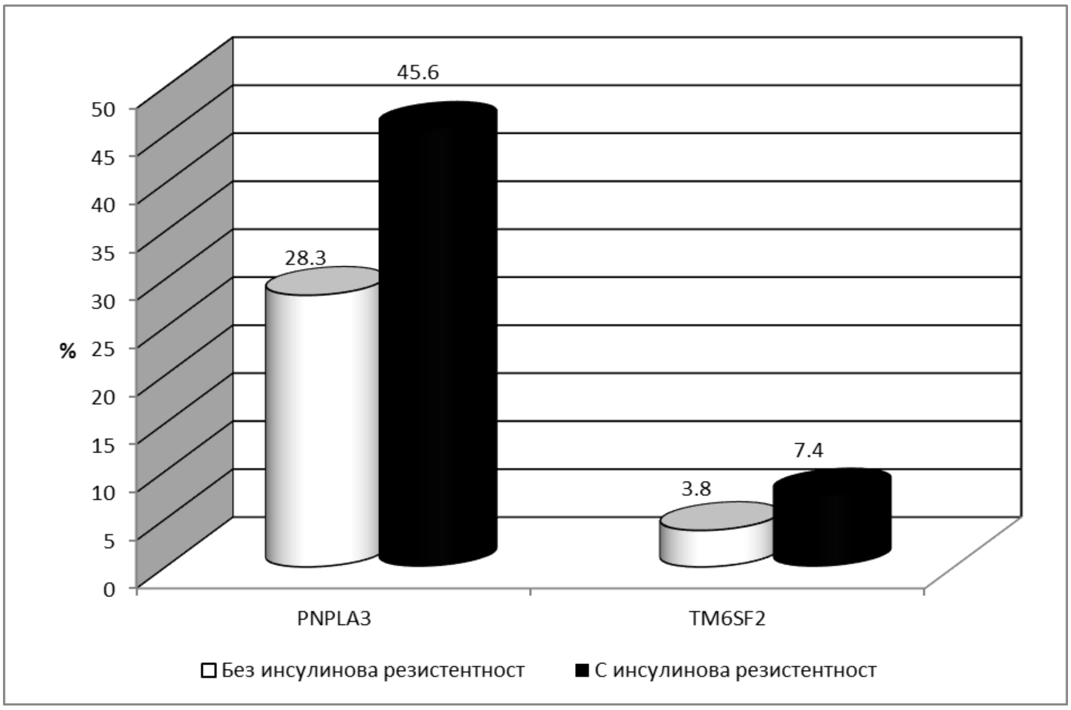



**Фиг 20.** Анализ на връзката между норми и варианти на PNPLA3 и TM6SF2 и МС

Установихме сигнификантна зависимост между генетичните промени и **МС**. При **PNPLA3**, процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи ($p=0,003$). При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не се установи.

При **TM6SF2** процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи (p=0,019).

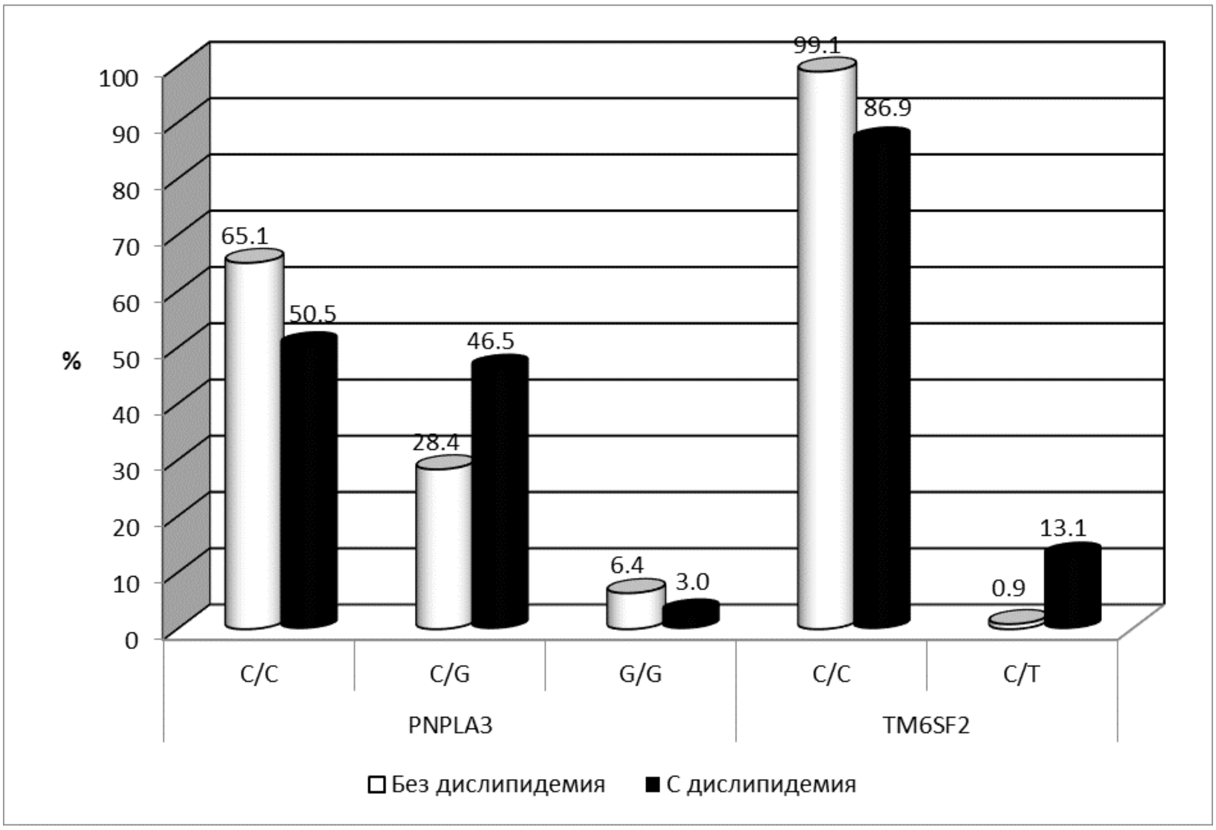
Резултатите от анализа на връзката между генетичните промени и **ИР** са представени на **фиг. 21**.




**Фиг. 21.** Анализ на зависимостта между норми и варианти на PNPLA3 ген и TM6SF2 ген и ИР

Налице бе сигнификантна зависимост само между генетичните промени на **PNPLA3** и **ИР**. Процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с ИР (p=0,038), а в тази без ИР- статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи. При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не бе установена.

Резултатите от анализа на връзката между норми и варианти на PNPLA3 и TM6SF2 и **дислипидемията** са представени на **фиг.22.**




**Фиг. 22.** Анализ на връзката между норми и варианти на PNPLA3 ген и TM6SF2 ген и дислипидемията

Налице беше сигнификантна зависимост между генетичните промени и показателят дислипидемия.

При **PNPLA3** процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с дислипидемия, а в тази без дислипидемия - статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи (p=0,021). При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не беше установена.

При **TM6SF2** различията имаха идентичен характер (p<0,001), като характерното за изследвания полиморфизъм в този ген беше връзката му с повишените ТГ и VLDL, което беше отбелязано по-горе на фиг. 19.

Анализът между PNPLA3, TM6SF2 и изследваните хепатокини FGF 21, AGF, футуин А и SHBG не показа наличие на сигнификантна връзка.

Анализът на връзката между генетичните нарушения в двата гена и показателите за микро- и макроангиопатия (ABI, IMT, NDS, ANR и VPT) също не показа наличие на сигнификантна връзка.

**Изследване на риска при генетичните промени за развитието на предиабет, МС и ИР**

Изследване на рискът за **предиабет**. За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ, резултатите от който са показани на **табл. 50.**

**Табл. 50.** Резултати от регресионния анализ за оценка на предиктивната стойност на изследваните гени и алели за възникване на предиабет

| **Гени** | **Сравнение на алелите** | **Индивидуално** | | | | **Групово** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | OR | 95% CI Долна граница | 95% CI Горна граница | p | OR | 95% CI Долна граница | 95% CI Горна граница | p |
| PNPLA3 | CG+GG / CC | 9,649 | 2,100 | 44,328 | **0,004** | 4,363 | 2,339 | 8,138 | **<0,001** |
| TM6SF2 | CT/ CC | 3,913 | 2,177 | 7,035 | **<0,001** | 11,024 | 2,211 | 54,954 | **0,003** |

В индивидуален план със сигнификантни отношения на рисковете се оказаха и двата изследвани гена PNPLA3 и TM6SF2. При хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена **PNPLA3 (CG+GG)** спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на **предиабет** е **9,6 пъти** по-висок (p<0,001). При хетерозиготните варианти на гена **TM6SF2 (CT)** спрямо нормални хомозиготи, рискът за възникване на предиабет е **3,9 пъти** по-висок (p=0,003).

По отношение на рискът от **МС** свързан с генните мутации бинарната логистична регресия даде следните резултати **(табл. 51).**

**Табл. 51.** Резултати от регресионния анализ за оценка на предиктивната стойност на изследваните гени и алели за възникване на МС

| **Гини** | **Сравнение на алелите** | **Индивидуално** | | | | **Групово** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | OR | 95% CI | | p | OR | 95% CI | | p |
| | | | Долна граница | Горна граница | | | Долна граница | Горна граница | |
| PNPLA3 | CG + GG / CC | 2,939 | 1,590 | 5,434 | **0,001** | 3,043 | 1,642 | 5,638 | **<0,001** |
| TM6SF2 | CT / CC | 8,444 | 1,082 | 65,881 | **0,042** | 10,633 | 1,341 | 84,320 | **0,025** |

При хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена **PNPLA3 (CG+GG)** спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на **МС** е почти **3 пъти** по-висок (p=0,001). При хетерозиготните варианти на гена **TM6SF2** спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на **МС** е **8,4 пъти по-висок** (p=0,042).
В групов план тези фактори запазиха рисковия характер на своето влияние, като PNPLA3 запази стойността на отношението на рисковете, а TM6SF2 го увеличи.

По отношение на рискът за ИР свързан с генните мутации, бинарната логистична регресия даде следните резултати **(табл.52):**

**Табл. 52**: Анализ на връзката между генетичните промени и инсулиновата резистентност

| Ген | Алели | Честота | Без ИР | С ИР | P |
|---|---|---|---|---|---|
| PNPLA3 | CC | n | 38 | 81 | **0,038** |
| | | % | 71,7[a] | 54,4[b] | |
| | CG | n | 15 | 59 | |
| | | % | 28,3[a] | 39,6[a] | |
| | GG | n | 0 | 9 | |
| | | % | 0[a] | 6,0[a] | |
| TM6SF2 | CC | n | 51 | 138 | 0,520 |
| | | % | 96,2[a] | 92,6[a] | |
| | CT | n | 2 | 11 | |
| | | % | 3,8[a] | 7,4[a] | |

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p<0,05$)

Със сигнификантно отношение на рисковете се оказа единствено генът PNPLA3. При хетерозиготните варианти на този ген (CG+GG) спрямо нормалните хомозиготи, рискът за развитие на ИР е **2,1 пъти** по-висок (p= 0,038**).**

# VI. Обсъждане

Неалкохолната стеатозна болест е най-честото чернодробно заболяване както при възрастните, така и при децата, което се асоциира с инсулинова резистентност и е тясно свързано с метаболитния синдром [32]. Поради нарастващата епидемия от затлъстяване и ЗД2 , заедно със застаряването на населението, разпространението на НАСБ се увеличава значително, като обхваща до една четвърт от възрастните хора по света [294]. Значението на НАСБ се дължи на факта, че не се ограничава само като прогресивно чернодробно заболяване, но също така включва и голям брой извънчернодробни усложнения. Водещите причини за смъртност сред пациентите с НАСБ са сърдечно-съдови заболявания, последвани от нечернодробни карциноми и усложненията на НАСБ, включително цироза и хепатоцелуларен карцином [295].

Всъщност НАСБ представлява едно мултисистемно заболяване, при което се нарушава регулирането на множество метаболитни и възпалителни пътища, играещи важна роля в развитието на редица ССЗ, ЗД2 и други метаболитни заболявания.

НАСБ се свързва също така със значителни икономически разходи, като пациентите с терминални чернодробни усложнение са основна група кандидати за чернодробна трансплантация. Нарастващото разпространението на НАСБ и тежките потенциални усложнения на НАСХ създават необходимост от търсене и използване на ефективни методи за идентифициране на тези пациенти. Въпреки че биопсията е призната за златен стандарт за диагноза на НАСБ, съществуват много ограничения за нейното приложение, свързани с квалифициран персонал, невъзможност за масова практика, както и риск от тежки усложнения, вкл. смъртност, кървене и болка. Ето защо са необходими неинвазивни методи за избягване на биопсията в диагностиката на НАСБ, като в тази насока усилено се работи през последните години. Приложението на достатъчно надеждни биохимични, генетични, инструментални и др. методи би могло също така да идентифицира най-рисковите лица за бърза прогресия на НАСБ, които да бъдат насочени за хистологична оценка.

Установено е, че черният дроб може да повлияе на метаболизма на липидите и глюкозата чрез освобождаване на хепатокини, като НАСБ се свързва с промененото им производство. Някои от тях могат директно да повлияят риска от ЗД2 чрез неблагоприятно въздействие върху чернодробната глюконеогенеза, синтеза на гликоген и инсулиновата сигнализация. Освен това изглежда, че хепатокините могат да се разглеждат като биомаркери за ектопично натрупване на мазнини в черния дроб, както и като маркери за прогресията на заболяването. Предполага се, че някои от тях могат да бъдат цел за превенция и лечение на заболявания, свързани с инсулиновата резистентност, включително предиабета и НАСБ [296].

От друга страна през последните години се обръща все повече внимание на генетичните основи на НАСБ, както и на връзката им с факторите на околната среда в патогенезата на НАСБ с цел търсене на нови диагностични и терапевтични възможности.

**Ние си поставихме за цел да анализираме потенциални неинвазивни биомаркери, включително и генетични, свързани с НАСБ и тяхната връзка със затлъстяването и предиабета, които биха могли да се включат в бъдещи диагностични и мониторингови алгоритми. Популационната характеристика на пациентите и изследванията, които планирахме бяха определена от няколко съображения:**

1. Всички пациенти бяха с НАСБ в по-ранна фаза на развитие (НАС), която доказано е обратима, като беше изключена напреднала фиброза чрез използването на различни неинвазивни методи за оценка.

2. Тъй като връзката на НАСБ със затлъстяването е добре известна, ние елиминирахме влиянието на този фактор като всички пациенти бяха със затлъстяване в различна степен.

3. Тъй като връзката на НАСБ и на затлъстяването с диабета е детайлно описана, ние се спряхме на предиабета, който привлича все повече международното научно внимание като състояние с повишен сърдечносъдов и метаболитен риск, което е последната реална възможност да се промени гликемичната траектория на пациента и да не бъде допуснато развитието на диабет. Данните в литературата за НАСБ и предиабет са оскъдни. Така нашите пациенти бяха с НАСБ и затлъстяване, но се различаваха по отношение на това дали имат или не предиабет. Диабетът беше изключващ критерии. Правейки този избор си

дадохме сметка за риска, който поемаме, ориентирайки се към преходно състояние с ранни промени в хода на глюкозния континиум. Тези деликатни изменения намаляват вероятността за статистически значими разлики в изследваните показатели, особено като се има предвид невисоката честота на предиабета от една страна и ограничения финансов ресурс базиран на университетските грантове от друга.

4. При избора на биохимични, генетични и инструментални показатели се ръководехме от съображението наред с известни и валидирани индикатори за НАСБ и предиабет да съсредоточим вниманието си върху съвсем нови в световен мащаб неработени в България показатели при използваният от нас дизайн на изследванията.

5. Обобщавайки казаното, с изследванията си търсехме нови маркери за една слабо проучена интердисциплинарна област (НАСБ и предиабет) в ранните етапи на двете състояния, които са потенциално обратими и представляват интерес освен в научен, така и в чисто практически аспект.

**Ретинол свързващ протеин 4**

**Ретинол свързващ протеин 4 (RBP4)** участва в развитието на инсулиновата резистентност и се свързва с прогресията на тежестта на НАСБ [297]. Няма обаче достатъчно данни за връзката му с ранните етапи от нарушената глюкозна регулация при пациенти с НАСБ.

В нашето проучване установихме значимо по-високи средни стойности на RBP4 в групата на НАСБ с предиабет, както и при лицата с метаболитен синдром, в сравнение с групата със затлъстяване без въглехидратни нарушения и без метаболитен синдром. Влияние на артериалната хипертония не се установява върху нивата на RBP4, за разлика от дислипидемията. Със значимо по-висока средна стойност е групата на имащите дислипидемия. RBP4 корелира правопропорционално с показателите VAI, кръвна захар на 0 мин, кръвна захар на 60 мин., инсулин на 0 мин., инсулин на 120 мин. и HOMA- IR. Нашите данни съвпадат с данните представени от други автори по отношение на връзката между повишените нива на RBP4 с висцералното затлъстяване и инсулиновата резистентност [298-301]. Резултатите от проведен мета-анализ от Park и сътр.  показват положителни корелации между общия холестерол, триглицеридите и LDL и серумни нива на RBP4 при пациенти със ЗД2 [302].

Други автори не откриват връзка между нивата на RBP4 и кръвната захар или гликирания хемоглобин (HbA1c), като предполагат, че RBP4 не е маркер за въглехидратни нарушения [303].

От друга страна RBP4 е описан като връзка между нарушеното поемане на глюкоза в адипоцитите и системната инсулинова чувствителност [303]. Увеличените нива на RBP4 могат да действат директно за индуциране на експресията на фосфоенолпируват карбоксикиназа (PCK2) за увеличаване производството на глюкоза и за намаляване на действието на инсулина в хепатоцитите [304]. В допълнение, RBP4 може да предизвика инсулинова резистентност, като допринася за развитието на възпаление в мастната тъкан чрез активиране на проинфламаторни цитокини и макрофаги [305].

RBP4 е признат рисков фактор за развитие на ЗД2 [306]. В дългосрочно проспективно проучване Luft и сътр. показват, че по-високите нива на RBP4 предсказват развитието на ЗД2 по различен начин при мъжете и жените и може би е по- важен фактор за развитието на диабет предимно при женския пол [306]. В нашето проучване 92,4% от изследваната популация бяха жени, поради факта, че бяха обхванати хоспитализирани пациенти от Клиниката по ендокринология и болести на обмяната на УМБАЛ“Александровска“, където половото разпределение е почти аналогично. Не се установи корелация с микро- и макросъдовите параметри (индекса глезен мишница, дебелината на интима медиа, индекса за периферна невропатия, вибрационен праг и риска за автономна невропатия), което вероятно го прави не подходящ за оценка на микро- и макроваскуларния риск.

По отношение на предиктивната стойност, при имащите серумен RBP4≥ 61 mcg/ml спрямо тези с по-ниски нива, рискът за възникване на предиабет е 3,5 пъти по-висок, а при RBP4 ≥ 55 mcg/ml рискът за развитие на метаболитен синдром е 3,1 пъти по-висок. Ние не намерихме проспективно проучване в литературата, оценяващо предиктивната стойност на серумния RBP4 за развитие на предиабет.

**В заключение, в сравнение с контролната група без въглехидратни нарушения, RBP4 е повишен при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет, както и при метаболитен синдром и дислипидемия. RBP4 е свързан с повишен риск от предиабет и метаболитен синдром при тези пациенти. Не се установиха корелации между RBP4 и изследваните показателите за микро- и макроангиопатия.**

**Лумикан**

Лумиканът е екстрацелуларен матриксен протеогликан, сравнително скоро обсъждан като показател за чернодробна фиброза. Той участва в колагенната фибриногенеза в някои екстрахепатални тъкани, като значението му при чернодробните заболявания не е напълно изяснено. Имунохистохимичните изследвания показват, че хепатоцитите са преобладаващият източник на лумикановата експресия. Необходимо е да се определи дали повишеният синтез на лумикана е специфичен за НАСБ или играе по-широка роля в прогресията на чернодробната фиброза, независимо от основната етиология на заболяването [166]. Нивата на лумикана са повишени както при пациенти със затлъстяване и нормална чернодробна хистология, така и при начална стеатоза, като най-изявена е експресията му при НАСХ [166]. Различната експресия на лумикан през различните стадии на НАСБ дава възможност за ранна диагноза още в префибротичния стадии на НАСХ [168].
В нашето проучване установихме значимо по-високи средни стойности на лумикана в групата с предиабет. Ролята на ЗД2 в НАСХ и фиброзата при пациенти със затлъстяване е демонстрирана в няколко проучвания, които оценяват чернодробните биопсии при пациенти със затлъстяване, извършвани по време на бариатричната хирургия [307]. Общата честота на НАСБ е била 85–99%, а на НАСХ 24–58%.

Във всички проучвания НАСХ е по-често срещан при пациенти със ЗД2 в сравнение с контролите без диабет. Тези резултати потвърждават важността да се оцени рискът от чернодробна фиброза още в ранния предиабетен стадий. В нашето проучване открихме корелации между повишените серумните нива на лумикана и глюкозата на гладно в групата на предиабет. Установените резултати предполагат, че първоначалните фиброзни промени при НАСБ могат да започнат рано, още в предиабетните етапи и може да предположим, че повишеният лумикан като медиатор на фиброзата допринася за това развитие. Връзката между фиброзата на черния дроб и инсулиновата резистентност е разкрита в проучване при хора, при което експресията на колаген тип VI силно корелира с нарушенията на гликемията [308].

Анализирайки връзката между метаболитния синдром и лумикана се установи най-силна зависимост при наличие на четири и повече компонента на МС. Не се установи влияние на артериалното налягане и дислипидемията върху стойностите на лумикана. Не се установи корелация с изследваните показатели за микро- и макроангиопатия (индекса за чернодробна стеатоза, индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия).

По отношение на предиктивната стойност на лумикана, рискът за възникване на предиабет при лица с НАСБ е 3,9 пъти по-висок при измерени стойности $\geq$ 0,07 ng/ml.

Ние не намерихме проучване в литературата, оценяващо предиктивната стойност на серумния лумикан за развитие на предиабет.

**В заключение, настоящото проучване показа повишени серумни нива на лумикана при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет, както и при наличие на метаболитен синдром. По-високите нива на лумикана са свързани с повишен риск от предиабет при лица с НАСБ и затлъстяване. Не се установи корелация между лумикан и изследавните показатели за микро- и макроангиопатия.**

**Хемерин**

Хеменинът е сравнително скоро открит адипокин, който се счита, че повишава инсулин-стимулираното глюкозно поемане, повишава експресията на адипонектина и инхибира продукцията на проинфламаторни цитокини като IL-6 и TNF-α. [309]. Други проучвания установяват сигнификантно повишение на хемерина при пациенти с НАСБ и особено при НАСХ в сравнение със здрави лица [310]. Съществуват противоречиви и не достатъчни данни за връзката на хемерина с въглехидратните нарушения и НАСБ, както и с микро- и макросъдовите параметри.

В нашето проучване не установихме достоверна разлика по отношение на хемерина между двете основни групи – НАСБ със затлъстяване и предиабет и НАСБ със затлъстяване без въглехидратни нарушения, както и между групите с и без метаболитен синдром. Отсъствието на корелация между серумните нива на хемерина и въглехидратните нарушения в настоящото проучване може да се дължи на изследваната популация, състояща се от пациенти със затлъстяване и НАСБ без изявен ЗД2, както и от сравнително не големия брой изследвани пациенти. Данните в литературата показват, че Хемерин е свързан с НАСБ, затлъстяването и ЗД2, както и някои компоненти на МС, но много от тях остават спорни [162, 311].
Няколко проучвания съобщават, че чернодробното заболяване може да повлияе нивата на серумния хемерин, като установяват по-високи нива при пациенти с клинично или хистологично доказана НАСБ [159,162]. Съществуват доказателства, че проинфламаторните цитокини могат да играят роля в освобождаването на хемерин от мастната тъкан, което е установено в експериментални изследвания [312,313].
Други изследователи установяват, че хемеринът може да бъде маркер за МС, тъй като експресията му в мастната тъкан се увеличава при пациенти със затлъстяване [163]..
Данните от един мета-анализ показват, че триглицеридите, общия холестерол, ИТМ, обиколката на талията, съотношението талия/ханш и лептинът корелират положително с нивата на хемерина [314].
В нашето проучване хемеринът корелираше правопропорционално с показателите ИТМ, обиколката на ханша и VAI. По отношение на предиабета, дислипидемията и артериалната хипертония не се установи статистическа значимост с нивата на хемерина. Sell и сътр. установяват, че хемеринът корелира с обиколката на талията и обема на мастните клетки, като не може да се намери корелация с кръвното налягане и HOMA-IR [315]. Ние установихме, че хемеринът корелира изразено и правопропорционално с индекса за чернодробна стеатоза и то в групата с предиабет, което показва влияние на въглехидратните нарушения. Не се намира корелация с изследваните показатели за микро- и макроангиопатия (индекса глезен- мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия). Не се установява статистическа достоверност по отношение на риска от възникване на предиабет.

**В заключение, резултатите от нашето проучване при пациенти със затлъстяване и НАСБ показват връзка между хемерина, стеатозата и затлъстяването, но не с ранните въглехидратни нарушения, МС, дислипидемията и сурогатните маркери за инсулинова чувствителност и резистентност. Хемерин не корелира с изследваните показатели за микро- и макроангиопатия.**

**Пентраксин 3**

**Пентраксин 3 (PTX3)** е наскоро идентифициран острофазов реактант, който наподобява CRP както в структурата, така и във функцията, и с който принадлежат към една фамилия [173]. Идентифициарн е също така, като маркер за локално съдово възпаление [316]. Поради това не е изненадващо, че нивата на PTX3 са свързани с нестабилна стенокардия, инфаркт на миокарда, сърдечна недостатъчност и сърдечно-съдова смъртност [317]. Добре известно е, че НАСБ е независим рисков фактор за ССЗ. Серумните концентрации на PTX3 са значително по-високи при пациенти в напредналите стадии на НАСБ, като по-високите нива корелират с тежестта на чернодробна фиброза [318]. Въпреки това, все още не е оценено дали серумните нива на PTX3 са свързани с въглехидратните нарушения при пациенти с НАСБ, както и връзката им с определени параметри за микро-и макрсъсъдови нарушения.

В нашето проучване установихме значимо по-висока средна стойност на серумния PTX3 в групата на лицата с предиабет, което показва, че възпалителните процеси могат да започват още в ранния, предиабетен стадии. Zanetti и сътр. съобщават, че нивата на hs-CRP и PTX-3 са по-високи при пациентите с МС и те твърдят, че това повишение е свързано с възпаление и субклинична атеросклероза [319]. В друго проучване също се установява, че PTX3 е със значително по-високи нива при пациенти с МС, както и че серумните нива на PTX3 се повишават с увеличаването на компонентите на МС [320].

Нашите резултати показаха, че наличието на хипертония, дислипидемия, метаболитен синдром, както и инсулиновата резистентност не оказват влияние върху нивата на PTX3. Това може да се обясни с 1) сравнително малкия брой изследвани лица и 2) пациентите, бяха без сигнификантна фиброза от изследваните фиброзни скорове, т.е. нямаха напреднала НАСБ, където са характерни по-високите нива на PTX3.

Проведеният анализ за наличието на зависимост между нивата на PTX3 и параметрите индекс глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг, риска за автономна невропатия и индекса за чернодробна стеатоза установи, че PTX3 корелира само с индекса за периферна невропатия.

Това е първото проучване, което оценява връзката между серумните концентрации на PTX3 с микросъдовите параметри при пациенти с НАСБ. Ozturk и сътр. установяват корелация между нивата на PTX3 и атеросклерозата при пациенти с НАСБ [185]. Повишени серумни нива на PTX3 са свързани с наличието на фиброза при пациенти с НАСБ, независимо от компонентите на метаболитния синдром. Авторите предполага, че PTX3 може да се превърне в полезен маркер в разбирането на връзката между фиброзните промени при НАСБ и субклиничната атеросклероза, както и, че наличието на фиброза при пациенти с НАСБ може да бъде рисков фактор за атеросклероза.

Необходими са допълнителни изследвания за по-пълното разбиране на ролята на PTX3 при МС и НАСБ.

**В заключение, настоящото проучване показа повишени серумни нива на PTX3 при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет в сравнение с НАСБ със затлъстяване без въглехидратни нарушения. Няма значима разлика в нивата на PTX3 между пациентите с и без метаболитен синдром. Налице е положителна корелация между PTX3 и индекса за периферна невропатия.**

**WISP2**

**WISP2** е мултитъканен и мултифункционален адипокин с множество изразени клетъчно-специфични ефекти. Данните в литературата за WISP2 са сравнително оскъдни, като основно е изследван в туморогенезата като тумор-супресерен фактор. Счита се, че има протективен ефект при редица злокачествени заболявания, като ролята му в НАСБ и метаболитните нарушения не е достатъчно проучена.

В нашето изследване установихме, че WISP2 корелира слабо и правопропорционално само с индекса за висцерално затлъстяване (VAI) и триглицеридите. Нещо, което е интересно като резултат и което до мемента не е изследавно, е връзката на WISP2 с фиброзните скорове FIB-4 и APRI. Установи се, че WISP2 корелира правопропорционално и умерено по сила с FIB-4 и APRI. Не се установява връзка с предиабета, както и с метаболитния синдром и инсулиновата резистентност. Експерименталните изследвания показват, че WISP2 е в състояние да понижи инсулиновата резистентност, както и да увеличи енергийния разход и не мастната тъкан при миши модели [187]. Авторите свързват тези резултати с факта, че WISP2 е ендогенен растежен фактор предимно от подкожната мастната тъкан, усилващ обаче пролиферацията на мезенхимните прекурсорни клетки, както in vivo, така и in vitro. Нещо, което представлява интерес е, че WISP2 е не само силно експресиран в клетките прекурсори на мастната тъкан, но също така високо е експресиран в мускулните клетки, човешките миобласти, както и в остеобластите [321-323]. Резултатите ни вероятно са продиктувани от факта, че изследваните пациенти са основно с висцерален тип затлъстяване, докато WISP2 се явява по-скоро като протективен адипокин, който би могъл да понижи инсулиновата резистентност и е с произход главно от подкожната мастна тъкан. Проведеният анализ за наличието на зависимост между нивата на WISP2 и индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг, риска за автономна невропатия и индекса за чернодробна стеатоза установи, че WISP2 корелира умерено и правопропорционално с индекса глезен-мишница и вибрационнния праг. Това е първото проучване за връзката между WISP2 и показателите за микро- и макросъдови усложнения. Имайки предвид досега установените благоприятни ефекти на WISP2 по отношение на инсулиновата чувствителност и туморогенезата, ние очакваме положителен и протективен ефект и по отношение на атеросклеротичните промени при тези пациенти. Необходими са бъдещи проучвания, които ще проверят тази хипотеза.

**В заключение, настоящото проучване установи положителна корелация на WISP2 с фиброзните скорове FIB-4 и APRI, както и с VAI и триглицеридите. От показателите за микро- и макроангиопатия се установи корелация с ABI и VPT. Не се установиха разлики в нивата на WISP2 при пациенти с НАСБ, затлъстяване с и без предиабет, както и при пациенти с и без метаболитен синдром, с и без инсулинова резистентност.**

**Фибробластен растежен фактор 21**

**Фибробластен растежен фактор 21 (FGF-21)** е хепатокин, който се свързва с редица елементи от „multi-hits theory"в патогенезата на НАСБ, като оксидативен стрес, стрес на ЕПР, митохондриална дисфункция и субклинично хронично възпаление [211,212,324,325].

Участва също така в регулацията на липидния и въглехидратния метаболизъм по инсулин-зависим начин, като се счита, че намалява натрупването на мазнини в черния дроб [210,213,326]. От друга страна съществуват проучвания, които показват сигнификантно покачване на серумните концентрации на FGF-21 при пациенти с диагностицирана НАСБ в сравнение с контроли, като FGF-21 може да се приема за независим предиктор за НАСБ [213,327,328]. Нещо повече, някои автори предлагат FGF-21 като неинвазивен биомаркер в диференцирането между обикновената стеатоза и НАСХ заедно с цитокератин -18 [218]. Съществуват доказателства за връзката на FGF-21 със ЗД2, МС и инсулиновата резистентност. Голям метаанализ на Wang и сътр. показва повишени нива на FGF-21 при пациенти с изявен ЗД2 в сравнение с контроли, като нивата му корелират с ИТМ, общия холестерол и триглицеридите [329].

В нашето проучване установихме значимо по-висока средна стойност на FGF-21 при пациенти с НАСБ и предиабет, както и корелация между този показател със съотношението талия/ръст и индекса за висцерално затлъстяване (VAI). Потвърждение на чувствителността на FGF21 от резултатите ни беше, че стойностите му нарастват правопропорционално на тежестта на въглехидратните нарушения. Освен това се установи, че пациентите с метаболитен синдром и инсулинова резистентност имат значимо по-висока средна стойност на FGF-21.

Установихме също така висока предиктивана стойност на FGF-21 по отношение на риска от въглехидратни нарушения, като изчислената прагова стойност ≥ 320 pg/ml се свързва с 4,2 пъти по-висок риск за предиабет спрямо този на пациентите с по-ниски стойности. Бяха открити предиктивни стойности на FGF-21 и по отношение на риска от метаболитен синдром и инсулинова резистентност, като стойности ≥ 270 pg/ml се свързват с 4 пъти по-голям риск за МС и ≥ 260 pg/ml с 3,2 пъти по-голям риск за ИР.

Част от получените резултати съвпадат с резултатите на други студии [330,331].

Samms и сътр. съобщават за силно покачване на циркулиращите нива на FGF-21 в хода на ОГТТ, като установяват с кламп техника, че всъщност с инсулина, а не с глюкозата се обяснява постпрандиалното повишаване на FGF-21 [332].

Ние намерихма също така зависимост на FGF-21 с част от показателите на липидния профил (ТГ и VLDL), както и с ГГТ. В литературата съществуват хипотези, че повишените нива на FGF-21 са всъщност в резултат на изразена резистентност към неговото действие, като тя е връзката с патогенезата на НАСБ/НАСХ [333,334].
Нещо повече, авторите предполагат, че повишените нива на FGF-21 вероятно имат протективен ефект срещу липидните и въглехидратните нарушения. Венозното и подкожнато приложение на FGF-21 при експериментални модели и при хора с НАСБ, затлъстяване и ЗД2 води до подобряване на чернодробната стеатоза, редуцира инсулиновата резистентност и кръвната захар на гладно. Тези ефекти се свързват както с подобряване на инсулиновата чувствителност, така и с покачване нивата на адипонектина [221,225, 335]. Необходими са бъдещи проучвания с цел приложение на FGF-21 в лечението на НАСБ и свързаните метаболитни нарушения, включително ЗД2.

Има проучвания, които установяват връзка между FGF-21 и субклиничната атеросклероза оценена с дебелината на интима медиа при пациенти със ЗД2 [336-338].

Ние анализирахме FGF-21 и в рамките на показателите за микро-и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг), където не открихме корелации, което вероятно е свързано с липсата на сигнификантна атеросклероза при изследваните пациенти, така и с отсъствието на ЗД2. Не установихме и връзка между FGF-21 с изследваните фиброзни скорове използвани при НАСБ, както и с изследваните генетични варианти.

**В заключение, резултатите от нашето проучване показаха сигнификантно по-високи нива на FGF-21 при пациенти с предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност. Установи се положителна корелация между FGF-21, ТГ, VLDL и ГГТ, както и с WSR и VAI. По-високите нива на FGF-21 се свързват с повишен риск от предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност. Не се установи корелация с показателите за микро- и макроангиопатия.**

**Фетуин А**

**Фетуин А** се счита за хепатокин, чийто ген е локализиран в хромозома 3q27, която се приема са за локус свързан са ЗД2 и МС [198]. Фетуин А е мултипотентен гликопротеин, който участва в регулацията на костния метаболизъм, миграцията на кератиноцити и в контрола на протеолитичната активност. Също така се счита за биомаркер за невровегетативни заболявания, както и за индикатор за инсулинова резистентност, сърдечносъдов риск, ендотелна дисфункция и субклинична атеросклероза [193,196,199, 339,340]. Съществуват доказателства за връзката между фетуин А, затлъстяването, инсулиновата резистентност и НАСБ [196,199,341]. Няколко студии демонстрират сигнификантно по-високи нива на фетуин А при пациенти с хистологично потвърдена НАСБ [194, 203].

В нашето проучване не установихме разлика в нивата на фетуин А в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Не се установи разлика в нивата при пациентите с и без метаболитния синдром, със и без инсулиновата резистентност. Не открихме и корелации с нивата на показателите от липидния профил, чернодробните ензими и антропометричните показатели. Съществуват доказателства за връзката на фетуин А със ССЗ, независимо от познатите рискови фактори като артериална хепертония и тютюнопушене, като повишените нива се свързват с повишен риск от миокарден инфаркт и мозъчен инсулт [195]. Ние анализирахме фетуин А в рамките на показателите за микро-и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг), където се установи слаба корелация с индекса глезен мишница (ABI).

**В заключение, резултатите от нашето проучване показаха корелация на фетуин А с индекса глезен мишница (ABI). Не се установиха разлики в нивата на фетуин А в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Не се установи разлика в нивата при пациентите с и без метаболитен синдром, с и без инсулинова резистентност.**

**Ангиопоетин-свързан растежен фактор**

**Ангиопоетин-свързан растежен фактор (AGF)** се секретира предимно от черния дроб и е идентифициран от Oike и сътр. през 2003 година [226]. Авторите установяват, че при експериментални модели мишки ниските нива на AGF се свързват със затлъстяване, инсулинова резистентност и натрупване на липиди в черния дроб и скелетната мускулатура. Установяват също така,че свръхекспресията на AGF чрез аденовирусна трансдукция се свързва с повишаване на циркулиращите нивата на AGF. Този хепатокин се счита, че има важна функция в липидния и въглехидратния метаболизъм и вероятно е протеин, който намалява инсулиновата резистентност и затлъстяването [242]. Ebert и сътр. установяват, че серумните концентрации на AGF са сигнификантно повишени при пациенти със ЗД2 в сравнение с не диабетици [227].

В нашето проучване не установихме разлика в нивата на AGF в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Съществуват данни в литературата за повишени нива на AGF при пациенти с МС в сравнение с контроли, както и че МС е предиктор за серумните му нива [228]. Ние не установихме разлика в нивата при пациентите с и без МС, със и без ИР. Не открихме и корелации с показателите от липидния профил и чернодробните ензими. От антропометричните показатели се установи корелация между AGF и съотношението талия/ханш. От анализа, който направихме на AGF в рамките на показателите за микро-и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг) също не баха открити корелации, както и с двата изследвани генетични варианта. Не съществуват публикувани данни за пряката роля в НАСБ, но по отношение на въглехидратния метаболизъм се счита, че AGF потиска глюкозната продукция в хепатоцитите чрез намаляване на експресията на глюкозо-6-фосфатазата [229].

*In vitro* проучвания демонстрират намаляване на чернодробната глюкозна продукция след лечение с AGF, което показва, че може да намери приложение като нов терапевтичен таргет при пациенти с ЗД2, затлъстяване, МС , както и с НАСБ [229].

Бъдещи проучвания в тази насока ще покажат дали това е възможно.

**В заключение, резултатите от нашето проучванене не установиха разлики в нивата на AGF в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Не установихме разлика в нивата при пациентите с и без метаболитен синдром, с и без инсулинова резистентност. Не бяха открити корелации с изследваните показатили за микро- и макроангиопатия, както и с генетичните мутации. Налице е корелация с параметъра талия/ханш (WHR)**.

**Секс-хормон свързващ глобулин**

**Секс-хормон свързващ глобулин (SHBG),** който се произвежда основно от черния дроб и чиято основна роля е свързана с транспорта на половите хормони, притежава и редица други функции. Той се свързва с глюкозната обмяна, затлъстяването и компонентите на метаболитния синдром [231,232,343]. В проучване проведено при постменопаузални жени с хистологично доказана НАСБ са установени по-ниски концентрации на този хепатокин в сравнение с контроли, като също така е установена връзка между серумните му нива с НАСБ независимо от възрастта, ИТМ и обиколката на талията [233]. Също така понижени нива на SHBG при НАСБ са намерени и при пациенти със ЗД2 [234].

В нашето проучване не установихме разлика в нивата на SHBG в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Установихме обратнопропорционална корелация с обиколката на талията, съотношението талия/ханш, както и с инсулина на 60 мин. от ОГТТ. Някои поручвания докладват понижаване на серумните концентрации на SHBG с увеличаването на чернодробното мастна съдържание, както и че промяната в начина на живот и редукцията на тегло водят до покачване на нивата му [235]. Тези резултати не се потвърждават от всички студии. Bonnet и сътр.установяват обратнопропорционална корелация между SHBG, гликирания хемоглобин, кръвната захар на гладно и триглицеридите, както и позитивна корелация с HDL при мъже с МС [239]. Ние не намерихма връзка с МС и неговите компоненти, както и с ИР и с изчислените фиброзни скорове. Не се установи връзка с нивата на SHBG и с изследваните генетични варианти. Не се установи и разлика също така при пациентките с и без менопауза.

**В заключение, резултатите от нашето проучване показаха обратнопропорционална корелация на SHBG с обиколката на талията, съотношението талия/ханш, както и с инсулина на 60 мин. от ОГТТ. Не се установиха разлики в нивата на SHBG в двете основни групи, както и връзка с предиабета, метаболитния синдром, инсулиновата резистентност и с изчислените фиброзни скорове. Не се установи връзка с нивата на SHBG и с изследваните генетични варианти.**

Резултатите, които получихме за фетуин А, AGF и SHBG вероятно са продиктувани от сравнително близката метаболитна характеристика на основните групи пациенти в проучването, като всички участниците са със затлъстяване и НАСБ, което се оказва може би по-силен предиктор за тези хепатокини в сравнение с въглехидратните нарушения и метаболитния синдром като цяло. Необходими са бъдещи проучвания с участието на различни групи лица за уточняване и разбиране на ролята на тези хепатокини в патогенезата на НАСБ и връзката им с метаболитните нарушения.

**PNPLA3 и TM6SF2**

Различни гени и генни мутации са във фокуса на НАСБ през последните десет години, като усилено се изследва тяхната функция и роля в развитието и прогресията до НАСХ, фиброза, цироза и хепатоцелуларен карцином. До момента съществуват множество доказателства за тяхното независимо от метаболитните рискови фактори значение за НАСБ [334-336], които обаче се опровергаха от няколко големи кохортни проучвания с участието на над 15 хиляди души [347].

Ние изследвахме за първи път сред българска популация двата най-чести варианта на гените PNPLA3 и TM6SF2, свързани с развитието и прогресията на НАСБ, а именно PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K. Честотата на хетерозиготните варианти при PNPLA3, както и честотата на хетерозиготните варианти в TM6SF2, които открихме не се отличава съществено от резултатите получени при други големи проучвания сред европейската раса с известна разлика по отношение на хомозиготните варианти при PNPLA3, където установихме по-ниска честота [244,345]. Резултатите показаха сигнификантна зависимост между генетичните промени и въглехидратните нарушения.

При PNPLA3, процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази със затлъстяване без въглехидратни нарушения, статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. При TM6SF2 също процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази без предиабет - статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. Palmer и сътр. установяват за първи път в две големи проучвания, че PNPLA3 I148M вариант е свързан с инсулинова резистентност и повишен риск от ЗД2 при голяма кохорта със затлъстяване, въпреки относително по-ниските серумни триглицериди [347].

В нашето проучване за първи път се установи, че при хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена PNPLA спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на предиабет е 9,6 пъти по-висок. При хетерозиготните варианти на гена TM6SF2 спрямо нормални хомозиготи, рискът за възникване на предиабет е 3,9 пъти по-висок. Скорошен мета-анализ на 65 изследвания установи, че полиморфизмът на PNPLA3 rs738409 не е само фактор свързан с риска от НАСБ, но и с възможността за прогресия на заболяването [258]. Асоциацията на варианта I148M с чернодробното липидно съдържание е свързана с участието и на други рискови фактори, като висцерално затлъстяване, повишен прием на захари или омега-6 полиненаситени мастни киселини, както и други генетични фактори [245,348-352].

Установихме връзка между генетичните промени и метаболитния синдром и неговите компоненти, като при PNPLA3, процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. При TM6SF2 също процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи.

Нещо повече, при хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена PNPLA3 спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на метаболитен синдром е 3 пъти по-висок. При хетерозиготните варианти на гена TM6SF2 спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на метаболитен синдром е 8,4 пъти по-висок. Cui et al. изучават голям брой гени и техните ефекти върху НАСБ и МС, като констатират, че от 44% от гените асоциирани с НАСБ почти 14% от тях са свързани и със ЗД2, затлъстяване и хипертония едновременно[253]. Съществуват противоречиви резултати в досегашните проучвания по отношение на PNPLA3 I148M и връзката му липидните нарушения.

Проучване с италиански и британски пациенти с НАСБ показва, че генотиповете на GG и CG се свързват с по-висок LDL и по-нисък HDL холестерол [266].

Други проучвания установявт понижени нива на ТГ при носителите на патологичния G алел [347]. Нашето проучване не установи връзка между генетичните промени на PNPLA3 и отделните параметри на липидния профил (общия холестерол, HDL, LDL, триглицериди и VLDL), за разлика от TM6SF2 E167K варианта, където хетерозиготите по патологичния алел имат значимо по-високи средни стойности на показателите VLDL и ТГ. От друга страна нормалните хомозиготи имат статистически достоверно по-висока средна стойност на HDL. Ние също така установихме сигнификантна зависимост между генетичните промени и показателя дислипидемия. При PNPLA3 процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с дислипидемия, а в тази без дислипидемия - статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. При TM6SF2 различията имат идентичен характер. Интересни резултати се установеха при изследването на чернодробните ензими. Най-високи нива на АСТ, АЛТ и ГГТ се установиха при хомозиготните варианти при PNPLA3 за разлика от хетерозиготните варианти и нормалните хомозиготи. При TM6SF2 разлика в нивата на трансаминазите не бе открита между вариантите на гена и дивия алел, като показателите бяха в нормални стойности и при двете групи. Тези резултати се подкрепят от редица проучвания. Връзката между I148M варианта с повишените нива на чернодробните еними и по-специално с АЛТ за първи път се описват в *Genome-wide association study (GWAS)* [244]. Тези резултати се потвърждават и в голям метаанализ, където се описва сигнификантна връзка между rs738409 варианта с повишени нива на АЛТ [262]. По отношение на връзката между генетичните промени и инсулиновата резистентност установихме сигнификантна зависимост с генетичните промени само при PNPLA3 I148M варианта. Процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с ИР, а в тази без ИР- статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. Рискът от инсулинова резистентонст при носителите на този алел е 2,1 пъти по-висок в сравнение с нормалните хомозиготи. Анализът на връзката между изследваните генетични полиморфизми и фиброзните скорове установи значимо по-високи стойности на FIB-4 и APRI при хомозиготните и хетерозиготните носители на патологичния алел на PNPLA3 спрямо нормалните хомозиготи. Анализът на връзката между генетичните нарушения и показателите за микро- и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия) не установи значими разлики при пациенти с и без генетични промени. Необходими за бъдещи проучвания с по-голям брой изследвани пациенти за потвърждаване на тези резултати.

**В заключение, това е първото за България генетично проучване при пациенти с НАСБ, затлъстяване и предиабет, при което се установява връзка между генетичните промени в изследваните от нас гени PNPLA3 и TM6SF2 и метаболитните нарушения, включващи предиабет, метаболитен синдром, дислипидемия и инсулинова резистентност. Установехме също така, че лицата носители на тези генетични полиморфизми имат повишен риск за развитие на предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност.**

Макар и до голяма степен в теоретичен етап на развитие, регулирането на PNPLA3 I148M дава обещание като реална възможност за терапевтична интервенция. По-нататъшното усъвършенстване на познанията ни относно генетичните нарушения и тяхната връзка с външните фактори, както и със съпътстващите метаболитни отклонения има потенциала да промени начина, по който се грижим за пациентите с НАСБ, с персонализиран подход към тяхното наблюдение, съобразен с индивидуалния риск от прогресия на фиброзата и лечение, насочено към основните механизми на болестта. Необходими са бъдещи проспективни проучвания за потвърждаване на получените резултати в по-големи групи пациенти.

**В обобщение на резултатите от проведените от нас изследвания съставихме алгоритъм, който да се използва в клиничната практика за ранна диагноза на НАСБ и отдиференциране на пациентите с метаболитни рискови фактори с висок риск за наличие или развитие на НАСХ с клинично значима фиброза, цироза и ХЦК, и обратно разкриване на метаболитни нарушения при НАСБ.**

## I. Метаболитни рискови фактори, свързани с първична НАСБ:

А. Метаболитен синдром /повишени триглицериди

Б. ЗД2 или предиабет (нарушена гликемия на гладно (НГГ) и/или нарушен въглехидратен толеранс (НВТ)

В. Инсулинова резистентност (HOMA-IR>2.5)

Г. Затлъстяване / абдоминално затлъстяване

**При всяко лице с наличие на 1 или повече метаболитни рискови фактори:**

**Скрининг**

1. ***Първа стъпка*: Откриване на НАСБ сред болни с метаболитни рискови фактори**
2. ***Втора стъпка*: Откриване на болни с прогресивно заболяване и лоша прогноза (тежък НАСХ с клинично значима фиброза, цироза и риск за ХЦК)**

## 1. Откриване на НАСБ сред болни с метаболитни рискови фактори

- Анамнеза, физикален преглед: алкохол, прием на медикаменти, известни чернодробни заболявания;
- анти-HCV и HbsAg
- Чернодробните ензими (АСТ, АЛТ и ГГТ)
- Абдоминална ехография - първо средство на избор за диагноза
- При невъзможност за извършването й - Консултация с гастроентеролог – за потвърждаване на НАСБ и изключване на друго чернодробно заболяване

### 1.1. Без стеатоза и нормални чернодробни ензими

**Проследяване с изследване за НАСБ (абдоминална ехография, чернодробни ензими):**

- На 3 - 5г. при възраст < 40 г., ИТМ < 30, липса на ЗД 2 и разгърнат МС

- По-често при наличие на един или повече от горепосочените параметри и при задълбочаване на метаболитните отклонения
- Промяна в начина на живот, лечение на метаболитните отклонения /заболявания
- Проследяване – ОПЛ, ендокринолог

### 1.2. Стеатоза (НАСБ)

**При всеки болен със стеатоза следва стъпка 2**

## 2. Оценка на риска за прогресивно заболяване и лоша прогноза (тежък НАСХ с клинично значима фиброза, цироза и риск за ХЦК)

- Серумни маркери / скорове за НАСБ-фиброза: FIB-4 (>35г.) и NFS (задължителни), APRI (по-ниска предсказваща стойност), ELF (при възможност)
- Еластография (при възможност)
- Генетично изследване - полиморфизъм на PNPLA3 с или без TM6SF2
- **Минимален набор**: FIB-4 и NFS и консултация с гастроентеролог

### 2.1. Стеатоза без повишени ензими

### 2.1.1. Нисък риск

- Възраст < 40 г.; ИТМ < 30, липса на ЗД 2 и разгърнат МС
- FIB-4 ≤1.3 (≤ 2.0 > 65 г.) и/или NFS < -1.455 и/или APRI <0.5 и/или ELF <7.7
- Еластография *(FibroScan)* < 8 kPa (M probe) или < 7.2 kPa ( XL probe)
- Носителство на нормални гени PNPLA3 (CC) и TM6SF2 (CC)
- Проследяване на ензими и фиброзни биомаркери през 2 или 3 г. , съобразно наличието на някои рискови фактори или липса на всички рискови фактори, или при задълбочаване на метаболитните отклонения
- Проследяване от ОПЛ и ендокринолог, гастроентеролог – при необходимост и за изключване на друго чернодробно заболяваве
- Лечение – промяна в начина на живот, корекция на метаболитните отклонения /заболявания

### 2.1.2 Умерен и висок риск

- Възраст >40 г., ИТМ ≥ 30, ЗД 2 и разгърнат МС
- АСТ > АЛТ, тромбоцити < 150 G/l
- FIB-4 >1.3 (>2.0 >65 г.) и/или NFS > -1.455 и/или APRI >0.5 и/или ELF >7.7
- Еластография *(FibroScan)* ≥ 8 kPa (M probe) или ≥ 7.2 kPa ( XL probe)
- PNPLA3 и/или TM6SF2 носителство на рисковата мутация - PNPLA3 I148M (CG и GG) и/или TM6SF2 E167K ( TT и CT)
- Консултация с гастроентеролог – показана е чернодробна биопсия
- Лечение: Промяна в начина на живот, лечение на метаболитните отклонения /заболяванияе, НАСБ-насочена терапия – след чернодробна биопсия
- Проследяване – мултидисциплинарен екип – гастроентеролог и ендокринолог, други специалисти - при необходимост

### 2.2. Стеатоза с повишени ензими

- Консултация с гастроентеролог за: задълбочена оценка на тежестта на чернодробното заболяване; изключване на друго чернодробно заболяване, показана е чернодробна биопсия или друго изследване, потвърждаващо цироза, варици на хранопровода или ХЦК, лечение
- Проследяване – гастроентеролог, ендокринолог, други специалисти - мултидисциплинарен подход

## II. Разкриване на метаболитни нарушения при НАСБ

**При всяко лице с НАСБ:**

**Скрининг за откриване на метаболитни рискови фактори / заболявания сред пациентите с НАСБ**

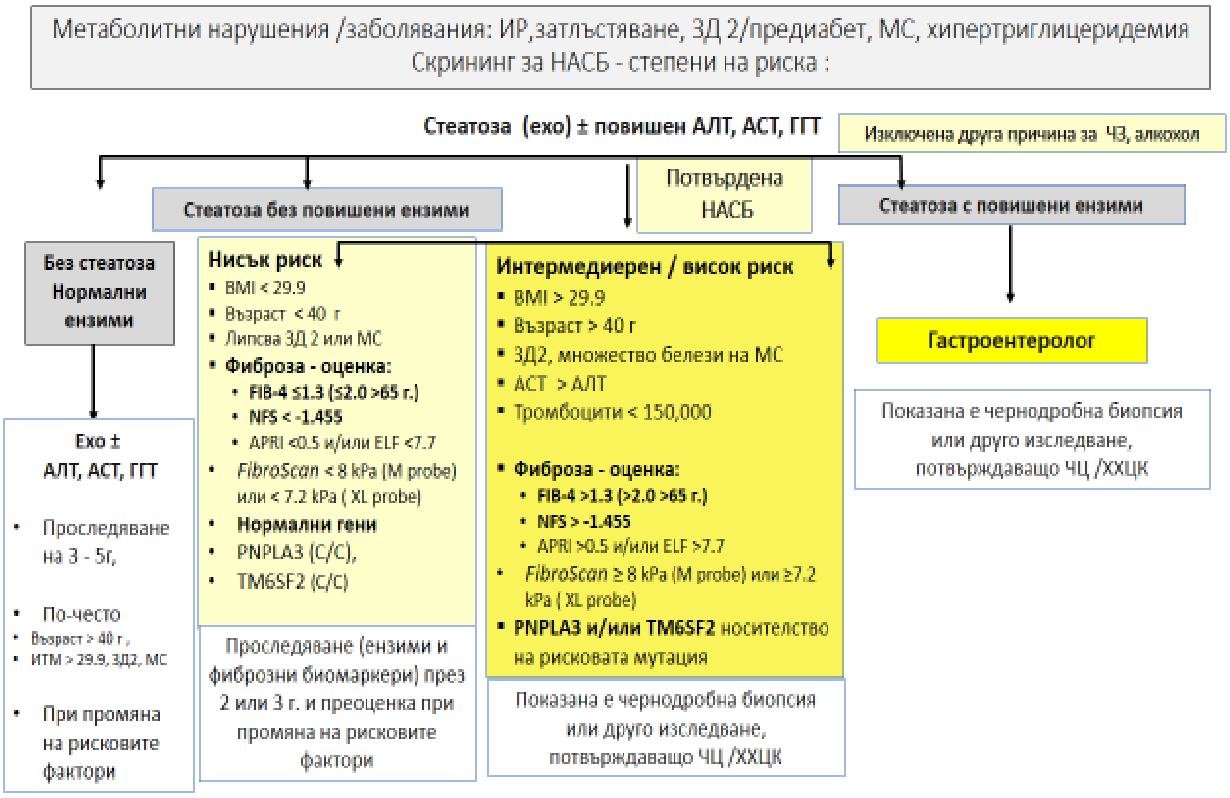
1. Затлъстяване, абдоминално затлъстяване, артериална хипертония: ИТМ, коремна обиколка, измерване на артериално налягане и анамнестични данни за прием на антихипертензивни лекарствени средства
2. Инсулинова резистентност: инсулин, (HOMA-IR>2.5)
3. ЗД2 или предиабет (нарушена гликемия на гладно (НГГ) и/или нарушен въглехидратен толеранс (НВТ): глюкоза на гладно, ОГТТ, HвA1c, анамнестични данни за прием на антидиабетни лекарствени средства

4. Дислипидемия: общ холестерол, HDL, LDL, триглицериди, анамнестични данни за прием на антилипемични лекарствени средства
5. Метаболитен синдром
6. При липса на въглехидратни нарушения: определяне на рискови биомаркери (при възможност) за профилактика на предиабет при болни с НАСБ

При наличие на едно или повече метаболитно/и нарушение/я или заболяване/я:

- Консултация с ендокринолог – диагноза, лечение
- Профилактика, проследяване и лечение (промяна в начина на живот, корекция на метаболитните нарушения, НАСБ – насочена терапия (при необходимост)– мултидисциплинален екип

Схематично практическия алгоритъм за ранна диагноза и профилактика на метаболитните отклонения при НАСБ е представен на **фиг. 23**




**Фиг.23** Практически алгоритъм за ранна диагноза и профилактика на МС, предиабета и НАСБ – мултидисциплинарен подход

# VII. Изводи

1. Серумните нива на RBP4 при НАСБ със затлъстяване са по-високи при наличие на предиабет, МС и дислипидемия. Стойности на RBP4 ≥ 61 mcg/ml се свързват с **3,5 пъти** по-висок риск от предиабет и ≥ 55 mcg/ml с **3,1 пъти** по-висок риск за МС.
2. Серумните нива на Лумикан при НАСБ със затлъстяване са по-високи при наличие на предиабет и метаболитен синдром. При стойности на лумикан ≥ 0,07 ng/ml спрямо тези с по-ниски, рискът за предиабет е **3,9 пъти** по-висок.
3. Серумните нива на Хемерин не се повлияват от наличието на предиабет и метаболитен синдром при лица с НАСБ и затлъстяване. Хемерин корелира с чернодробната, общата и висцерална мастна тъкан (HSI, ИТМ, ханш и VAI).
4. Серумните нива на PTX3 при НАСБ със затлъстяване са по-високи при наличие на предиабет. Не бе установена разлика в нивата на PTX3 между пациентите с и без метаболитен синдром, но той корелира с индекса за периферна невропатия.
5. WISP2 корелира с показателя за висцерална мастна тъкан (VAI) и нивата на триглицеридите, както и с ABI и VPT. Не се установява разлика в нивата на WISP2 при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет, с и без метаболитен синдром.
6. Серумните нива на FGF21 при НАСБ със затлъстяване нарастват допълнително при наличие на предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност. FGF21 корелира с VAI, ТГ, VLDL и ГГТ. Стойности ≥ 320 pg/ml се свързват с **4,2 пъти** по-висок риск за предиабет, ≥ 270 pg/ml с **4 пъти** по-висок риск за метаболитен синдром и ≥ 260 pg/ml с **3,2 пъти** по-висок риск за инсулинова резистентност.
7. Нивата на хепатокините Фетуин А, AGF и SHBG не се влияят от въглехидратните нарушения и не корелират с компонентите на метаболитния синдром, фиброзните скорове и показателите за микро- и макроангиопатия при пацииенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.

8. Изследваният полиморфизъм на ген PNPLA3 I148M показва връзка и се явява рискова генетична мутация не само за НАСБ, но и за предиабет, метаболитен синдром, дислипидемия и инсулинова резистентност. Лицата носители на този полиморфизъм имат **9,6 пъти** по-висок риск за предиабет, **3 пъти** по –висок риск за метаболитен синдром и **2,1 пъти** по-висок риск за инсулинова резистентност.
9. Изследваният полиморфизъм на ген TM6SF2 E167K показва връзка и се явява рискова генетична мутация не само за НАСБ, но и за предиабет, метаболитен синдром и дислипидемия. Лицата носители на този полиморфизъм имат **3,9 пъти** по-висок риск за предиабет и **8,4 пъти** по-висок риск за метаболитен синдром.

# VIII. Справка за приносите

I. Според приоритетния си характер приносите могат да бъдат разгледани като такива

В световен мащаб:

1. За първи път се изследват двата основни генетични варианта участващи в развитието и прогресията на НАСБ PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K и връзката им с пълния спектър на метаболитния синдром, с нови биомаркери асоциирани с НАСБ, както и с основни показатели за микро- и макроангиопатия.
2. За първи път се изследват адипокините WISP2, PTX3, хемерин и лумикан при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
3. За първи път се анализират биомаркерите RBP4, лумикан, хемерин, WISP2 и FGF 21 с показателите за микро- и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия) при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.

В национален мащаб:

1. Проведено е първото до момента в България генетично изследване при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предибет.
2. За първи път се изследват нивата на RBP4, Лумикан, Хемерин, PTX3, WISP2, ангиопоетин свързан растежен фактор, фибробластен растежен фактор 21 и SHBG при пациенти с НАСБ, затлъстяване и предиабет.
3. Предложени са прагови стойности за RBP4, които се свързват с повишен риск от предиабет и за метаболитен синдром при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.

4. Предложени са прагови стойности за Лумикан, които се свързват с повишен риск от предиабет при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
5. Предложени са прагови стойности за Фибробластен растежен фактор 21, които се свързват с повишен риск от предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
6. За първи път се предлагат хепатокини като потенциални биомаркери за оценка на индивидуалния метаболитен риск.

II. Съобразно значимостта си в научно-теоретичен или клинично-приложен аспект приносите могат да бъдат систематизирани като

Приноси с научно-теоретичен характер:

1. Проведено е първото до момента в България генетично изследване при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предибет.
2. Изследвана е широка гама от хепатокини, адипокини и матриксни протеини (RBP4, Лумикан, Хемерин, PTX3, WISP2, SHBP, Фетуин А, Ангиопоетин свързан растежен фактор и Фибробластен растежен фактор 21) при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
3. Изследвана е честотата и връзката на генетичните промени с основните метаболитни нарушения при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
4. Сравнени са стойностите на основни фиброзни скорове с изследваните хепатикини, адипокини, както и с генетичните промени.
5. Оценени са параметрите за микро-и макроангиопатия при лица с НАСБ със затлъстяване и предиабет.

Приноси с приложен характер:

1. Направени са препоръки за провеждане на генетични изследвания при високо рискови пациенти с установена стеатозна болест и метаболитен синдром с/без предиабет с оглед ранна превенция и оценка на риска от прогресия на НАСБ до НАСХ, цироза и хепатоцелуларен карцином.
2. Предложени са прагови стойности за RBP4, които се свързват с повишен риск от предиабет, както и за МС при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
3. Предложени са прагови стойности за Лумикан, които се свързват с повишен риск от предиабет при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
4. Предложени са прагови стойности за Фибробластен растежен актор 21, които се свързват с повишен риск от предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност при пациенти с НАСБ и затлъстяване.
5. Предложен е алгоритъм за оценка на риска за НАСБ и метаболитни нарушения, базиран на изследваните органокини и генетични полиморфизми.

# IX. Публикации по темата на дисертацията

**Статии в чужди списания с IF**

1. **Karamfilova V** , Gateva A, Alexiev A, Zheleva N, Velikova T, Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Cherkezov N, Kamenov Z, Mateva L. The Association between Non-alcoholic fatty liver disease, Retinol-binding protein 4 and micro- and macro-vascular changes in obese patients with or without prediabetes. Arch Physiol Biochem. 2019;7:1-6 **IF = 2.110**
2. **Karamfilova V**, Gateva A, Assyov Y, Alexiev A, Savov A, Yaneva N, Ivanova I , Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Mateva L, Kamenov Z. PNPLA3 I148M Polymorphism in Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes. J Gastrointestin Liver Dis. 2019;28(4):433-438. **IF=2.063**
3. Gateva A, Kamenov Z, **Karamfilova V**, Assyov Y, Velikova T, El-Darawish Y, Okamura H Higher levels of IL-18 in patients with prediabetes compared to obese normoglycaemic controls. Arch Physiol Biochem. 2019;11:1-4. **IF = 2.110**
4. Naydenov S, Vasileva D, Manov E, Vasilev D, **Karamfilova V**, Runev N. Is it worth evaluating the coronary calcium score in patients with premetabolic and metabolic syndrome? Acta Medica Mediterranea. 2019;35: 1879 **IF = 0.835**

**Статии в реферирани български списания**

1. **В. Карамфилова**. Метаболитни промени и цитокини при неалкохолната стеатозна болест. Мединфо-Кардиология, Ендокринология и Неврология 2019, 9: 80-83.
2. **В. Карамфилова**. Затлъстяване и неалкохолна стеатозна болест. JP news. 2019, 9:18-20.

**Участия в научни форуми**

1. **В. Карамфилова.** Метаболитни аспекти на неалкохолната стеатозна болест. Доклад на IV Национален конгрес за млади гастроентеролози 29.03.2018 г., София
2. **В. Карамфилова**, Л. Матева, З. Каменов. Предиабет при лица с НАСБ и затлъстяване част от "Микро- и макросъдови промени при неалкохолната стеатозна болест с или без нарушения във въглехидратната обмяна**"** Доклад на IV Национален симпозиум по хепатология, Ноември 2018 г., София.
3. **Karamfilova V** , Gateva A, Alexiev A, Zheleva N, Velikova T, Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Cherkezov N, Kamenov Z, Mateva L. The association between retinol-binding protein 4 and prediabetes in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease *Endocrine Abstracts* (2019) **63** P1012 | DOI: 10.1530/endoabs.63.P1012. 21 Европейски конгрес по ендокринология, май 2019, Лион, Франция постер
4. **В. Карамфилова,** Л. Матева, З. Каменов. Неалкохолна стеатозна болест, затлъстяване и метаболитен синдром. Доклад на V Национална конференция на БЛС 24-26 октомври 2019 г, Несебър.

**Участия в научни проекти**

1. Конкурс „ГРАНТ-2017" на МУ-София ДОГОВОР № Д-114/02.05.2017 г. за финансиране на изследователски ПРОЕКТ с вх. № 8516/12.12.2016 г.на тема: „Микро- и макросъдови промени при неалкохолната стеатозна болест с или без нарушения във въглехидратната обмяна."

2. Конкурс „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения -2017" на МУ-София ДОГОВОР № Д - 233/15.12.2017 г. за финансиране на изследователски ПРОЕКТ с вх. № 4728/19.07.2017 г.на тема: „Нови биохимични, генетични и клинични маркери за оптимизиране на диагностиката и мониторирането на неалкохолната стеатозна болест при пациенти със затлъстяване и предиабет."
3. Конкурс „Млад изследовател-2019" на МУ-София ДОГОВОР № Д121/23.04.2019 „Хепатокини и тяхната връзка с неалкохолната стеатозна болест и метаболитния синдром при пациенти със затлъстяване и предиабет".

# X. Литература


1. Българско Дружество по Ендокринология. Препоръки за добра клинична практика при затлъстяване, 2019
2. Българско Дружество по Ендокринология. Препоръки за добра клинична практика при захарен диабет, 2019
3. Българско Дружество по Ендокринология. Препоръки за добра клинична практика при захарен диабет, 2016
4. Борисова АМ, Шинков А, Влахов Й, Даковска Л, Тодоров Т. Метаболитен синдром в българската популация през 2012 година. Ендокринология 2015; 3.
5. Борисова АМ, Шинков А, Влахов Й, Даковска Л, Тодоров Т. Характеристика на метаболитния синдром в българска популация. Ендокринология 2015; 3
6. Георгиева Ж. Биомаркери на сърдечно-съдовата система. В „Сърдечно-съдови биомаркери“, Арбилис ООД, София, България, 2012, 5-44
7. Иванова Р. Оценка на сърдечно-съдовия риск при неалкохолна стеатозна болест. Дисертация, 2014.
8. Каменов З, Гатева А, Христов В. Медикаментозно лечение за захарен диабет тип 2011, 2.
9. Любомирова М, Харангозов Е и сътр. Субклинична атеросклероза – задебеляването на интима-медиа при болни с влошена бъбречна функция. Диагностичен и терапевтичен ултразвук. 2012;2:78-84
10. Христов В, Гочева Н, Петкова М, Захариева С, Танкова Ц, Орбецова М, Кътова Ц, Б. Георгиев от името на работна група към БИМС. Консенсусна Българския институт „Метаболитен синдром“ за поведение при метаболитен синдром. Наука Ендокринология 2010; 2:53-70
11. Милчева Б, Орбецова М. Мастната тъкан – ендокринен орган. Ендокринология. 2014;2:64-72
12. Танкова Ц. Захарен диабет. Рискови фактори за захарен диабет тип 2. Ендокринология, 2013; 3:76-80
13. Танкова Ц, Чакърова Н,Даковска Л и сътр. Предиктивна стойност на рискови фактори за прогресия на предиабет в захарен диабет тип 2. Ендокринология 2012; XVII, 2:92-105

14. Танкова Ц. Захарен диабет и неалкохолна стеатозна болест. Наука Ендокринология. 2012:2
15. Чакърова Н, Ц. Танкова, Б Георгиев. (2011). Сърдечно-съдов риск и възможности за превенция при нарушена гликемия на гладно и нарушен глюкозен толеранс Наука ендокринология. 2011:1
16. Чакърова Н, Танкова Ц, Кирилов Г и сътр. Нетрадиционни маркери за сърдечно-съдов риск при предиабет – определяне на селумните нива на матриксна металопротеиназа -9. Ендокринология, 2010;1:4-8
17. Чакърова Н, Ц. Танкова, Б. Георгиев. (2011). Сърдечно-съдов риск и възможности за превенция при нарушена гликемия на гладно и нарушен глюкозен толеранс Наука ендокринология. 2011:1
18. Шипковенска Е, Л. Георгиева, Г. Генчев Профилактика на заболяванията, в "Приложна епидемиология и медицина базирана на доказателства". София, Делфи 2002, 121-138.
19. Assyov Y, A Gateva, A Tsakova, Z Kamenov. Irisin in the Glucose Continuum. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2016;124(1):22-7.
20. Atanassova P, Hrischev P, Orbetzova M, Nikolov P, Nikolova J, Georgieva E (2014). Expression of leptin, NGF and adiponectin in metabolic syndrome. Folia Biol (Krakow) 62(4): 301-6.
21. Borissova A-M, Shinkov A, Vlahov Y, Dakovska L, Todorov T. Higher Prevalence of Diabetes: From Evidence to Clinical Reality in Central and Eastern Europe – Recommendations from the International Central-Eastern European Expert Group. Diabetes Technol Ther. 2014;16(7):460-47
22. Gateva A, Kamenov Z, Karamfilova V, Assyov Y, Velikova T, El-Darawish Y, Okamura H.Higher levels of IL-18 in patients with prediabetes compared to obese normoglycaemic controls. Arch Physiol Biochem. 2019; 11:1-4.
23. Kamenov Z, A Gateva. Endocrine aspects of obstructive sleep apnea. Acta Med Kinki Univ. 2010;35; 67-75.
24. Lee J, Kim D,Yang J et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. Digestive and Liver Disease. 2010;42:503-508
25. Kamenov ZA, Traykov LD. Diabetic autonomic neuropathy. Adv Exp Med Biol. 2012; 771:176-93.

26. Kamenov ZA, Traykov LD. Diabetic somatic neuropathy. Adv Exp Med Biol. 2012;771:155-75.
27. Karamfilova V, Gateva A, Alexiev A, Zheleva N, Velikova T, Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Cherkezov N, Kamenov Z, Mateva L. The association between retinol-binding protein 4 and prediabetes in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. Arch Physiol Biochem. 2019;7:1-6.
28. Orbetzova MM, Koleva DI, Mitkov MD, Atanassova IB, Nikolova JG, Atanassova PK, Genchev GD. Adipocytokines, neuropeptide Y and insulin resistance in overweight women with gynoid and android type of adipose tissue distribution. Folia Med.2012; 54(3): 22-9
29. Tankova T. Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score as a screening tool for impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and undetected diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2011:92:46–52.
30. Tankova T, Chakarova N, Atanassova I, Dakovska L. Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score as a screening tool for impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and undetected diabetes.Diabetes Res Clin Pract. 2011;92(1): 46-52.
31. Tankova T, Chakarova N, Dakovska L, Atanassova I. Assessment of HbA1c as a diagnostic tool in diabetes and prediabetes. Acta Diabeto.2012; 49(5): 371-8.
32. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol (2016).
33. World Gastroenterology Organisation (WGO) Global Guidelines Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis, 2014.
34. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. Rev Recent Clin Trials 2014; 9: 126-133.
35. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. Clin Liver Dis 2016; 20: 205-214.
36. Fazel Y, Koenig, A.B, Sayiner M, Goodman, Z.D, Younossi, Z.M. Epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2016;65:1017–1025
37. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al.Risk of severe liver disease in NAFLD with normal aminotransferase levels:a role for insulin resistance and diabetes. Hepatology 2008;48:792–798

38. Alberti, K.G.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.C.; James, W.P.; Loria, C.M.; Smith, S.C.; et al. Harmonizing the metabolic syndrome. Circulation 2009, 120:1640–1645.

39. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement innonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2010;51:454–462.

40. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al.Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease.Gastroenterology 2005;128:1898–1906.

41. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, at al.National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. Lancet 2011;377:557-67

42. World Health Organization: Obesity. Preventing and Managing the Global Endemic. WHO Technical Report Series no 894. WHO. Geneva, 2000.

43. Polyzos S, Kountouras J, Mantzoros C. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. Metabolism Clinical and Experimental 2019:92;82-97.

44. Almeda-Valdes P, Aguilar-Olivos N, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Common features of the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. Rev Recent Clin Trials 2014; 9: 148-158

45. Machado MV, Cortez-Pinto H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. Int J Mol Sci 2016; 17: 481

46. Amarapurkar, D.N., Hashimoto, E., Lesmana, L.A., Sollano, J.D., Chen, P.J., and Goh, K.L. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? J Gastroenterol Hepatol. 2007; 22: 788–793

47. Bellentani, S., Saccoccio, G., Masutti, F., Croce, L.S., Brandi, G., Sasso, F. et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. Ann Intern Med. 2000; 132: 112–117

48. Chang, Y., Jung, H.S., Cho, J., Zhang, Y., Yun, K.E., Lazo, M. et al. Metabolically healthy obesity and the development of nonalcoholic fatty liver disease. Am J Gastroenterol. 2016; 111: 1133–1140

49. Pang, Q, Zhang, J.Y., Song, S.D., Qu, K., Xu, X.S., Liu, S.S. et al. Central obesity and nonalcoholic fatty liver disease risk after adjusting for body mass index. World J Gastroenterol. 2015; 21: 1650–1662
50. Cortez-Pinto, H.; Camilo, M.E.; Baptista, A.; de Oliveira, A.G.; de Moura, M.C. Non-alcoholic fatty liver: Another feature of the metabolic syndrome? Clin. Nutr. 1999, 18, 353–358.
51. Bedogni, G.; Miglioli, L.; Masutti, F.; Tiribelli, C.; Marchesini, G.; Bellentani, S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The Dionysos nutrition and liver study. Hepatology 2005; 42: 44–52.
52. Souza, M.R.; Diniz Mde, F.; Medeiros-Filho, J.E.; Araujo, M.S. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. Arq. Gastroenterol. 2012; 49: 89–96.
53. Assy, N.; Kaita, K.; Mymin, D.; Levy, C.; Rosser, B.; Minuk, G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. Dig. Dis. Sci. 2000; 45: 1929–1934.
54. Lopez-Suarez, A.; Guerrero, J.M.; Elvira-Gonzalez, J.; Beltran-Robles, M.; Canas-Hormigo, F.; Bascunana-Quirell, A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with blood pressure in hypertensive and nonhypertensive individuals from the general population with normal levels of alanine aminotransferase. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2011; 23: 1011–1017.
55. Lau, K.; Lorbeer, R.; Haring, R.; Schmidt, C.O.; Wallaschofski, H.; Nauck, M.; John, U.; Baumeister, S.E.; Volzke, H. The association between fatty liver disease and blood pressure in a population-based prospective longitudinal study. J. Hypertens. 2010;28: 1829–1835.
56. Marchesini, G.; Bugianesi, E.; Forlani, G.; Cerelli, F.; Lenzi, M.; Manini, R.; Natale, S.,Vanni, E.; Villanova, N.; Melchionda, N. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology 2003, 37.
57. Ryan, M.C.; Wilson, A.M.; Slavin, J.; Best, J.D.; Jenkins, A.J.; Desmond, P.V. Associations between liver histology and severity of the metabolic syndrome in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. Diabetes Care 2005; 28: 1222–1224.
58. Zhang T. Zhang C, Zhang Y, Tang F, Li H. Et al. Metabolic syndrome and its components as predictors of non-alcoholic fatty liver disease in a northern urban Han Chinese population: A prospective cohort study. Atherosclerosis 2015; 240: 144–148.

59. Rhoo, J.H.; Suh, Y.J.; Shin, H.C.; Cho, Y.K.; Choi, J.M.; Park, S.K. Clinical association between non-alcoholic fatty liver disease and the development of hypertension. J. Gastroenterol. Hepatol. 2014,; 29:1926–1931.
60. Rhoo, J.H.; Ham, W.T.; Choi, J.M.; Kang, M.A.; An, S.H.; Lee, J.K.; Shin, H.C.; Park, S.K. Clinical significance of non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for prehypertension. J. Korean Med. Sci. 2014;29: 973–979.
61. Hamaguchi, M.; Takeda, N.; Kojima, T.; Ohbora, A.; Kato, T.; Sarhui, H.; Fukui, M.; Nagata, C.; Takeda, J. Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the diagnostic criteria for the metabolic syndrome. World J. Gastroenterol. 2012; 18: 1508–1516.
62. Zhang, T.; Zhang, Y.; Zhang, C.; Tang, F.; Li, H.; Zhang, Q.; Lin, H.; Wu, S.; Liu, Y.; Xue, F. Prediction of metabolic syndrome by non-alcoholic fatty liver disease in northern urban Han Chinese population: A prospective cohort study. PLoS ONE 2014, 9, e96651
63. Smits, M.M.; Ioannou, G.N.; Boyko, E.J.; Utzschneider, K.M. Non-alcoholic fatty liver disease as an independent manifestation of the metabolic syndrome: Results of a US national survey in three ethnic groups. J. Gastroenterol. Hepatol. 2013; 28:664–670.
64. Adams L.A, Waters O.R, Knuiman M.W, Elliott R.R et al. NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: An eleven-year follow-up study. Am. J. Gastroenterol. 2009; 104: 861–867.
65. Ryoo J.H, Choi J.M, Moon S.Y et al. The clinical availability of non alcoholic fatty liver disease as an early predictor of the metabolic syndrome in Korean men: 5-year's prospective cohort study. Atherosclerosis 2013; 227: 398–403.
66. Hamaguchi,M.,Kojima,T.,Itoh,Y.,Harano,Y.et al. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. Am. J. Gastroenterol. 2007, 102, 2708–2715.
67. Mohan, V., Farooq, S., Deepa, M. Et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in urban south Indians in relation to different grades of glucose intolerance and metabolic syndrome. Diabetes Res Clin Pract. 2009;84:84-91.
68. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017

69. Vozarova, B., Stefan, N., Lindsay, R.S. et al. High alanine Aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. Diabetes 2002; 51:1889–1895.
70. Lee, D.H.; Ha, M.H.; Kim, J.H.; Christiani, D.C.; Gross, M.D.; Steffes, M.; Blomhoff, R.; Jacobs, D.R. Gamma glutamyltransferase and diabetes—A 4 years follow-up study. Diabetologia 2003; 46,:359–364.
71. Hanley, A.J.; Williams, K.; Festa, A.; Wagenknecht, L.E.; D'Agostino, R.B.; Haffner, S.M. Liver markers and development of the metabolic syndrome: The insulin resistance atherosclerosis study. Diabetes 2005; 54:3140–3147.
72. Ekstedt, M.; Franzén, L.E.; Mathiesen, U.L.; Thorelius, L.; Holmqvist, M.; Bodemar, G.; Kechagias, S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. Hepatology 2006;44:865–873.
73. Monami, M.; Bardini, G.; Lamanna, C.; Pala, L.; Cresci, B.; Francesconi, P.; Buiatti, E.; Rotella, C.M.; Mannucci, E. Liver enzymes and risk of diabetes and cardiovascular disease: Results of the Firenze Bagno a Ripoli (FIBAR) study. Metabolism 2008;57: 387–392.
74. Goessling, W.; Massaro, J.M.; Vasan, R.S.; D'Agostino, R.B.; Ellison, R.C.; Fox, C.S. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. Gastroenterology 2008; 135:1935–1944.
75. Ryu S, Chang Y, Woo H.Y, Yoo S.H, Choi N.K. et al. Longitudinal increase in gamma-glutamyltransferase within the reference interval predicts metabolic syndrome in middle-aged Korean men. Metabolism 2010;59:683–689.
76. Balkau B, Lange C, Vol S et al. Group Study D.E.S.I.R. Nine-year incident diabetes is predicted by fatty liver indices: The French D.E.S.I.R. study. BMC Gastroenterol. 2010; 10:56–66.
77. Sung, K.C.; Kim, S.H. Interrelationship between fatty liver and insulin resistance in the development of type 2 diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2011;96:1093–1097.
78. Sung, K.C.; Wild, S.H.; Byrne, C.D. Resolution of fatty liver and risk of incident diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013; 93:3637–3643.
79. Adams, L.A.; Waters, O.R.; Knuiman, M.W.; Elliott, R.R.; Olynyk, J.K. NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: An eleven-year follow-up study. Am. J. Gastroenterol. 2009; 104:861–867.

80. Sung,K.C.;Jeong,W.S.;Wild,S.H.;Byrne,C.D.Combinedinfluenceofinsulinresistance,overweight/obesity, and fatty liver as risk factors for type 2 diabetes. Diabetes Care 2012; 35:717–722.
81. Musso, G.; Gambino, R.; Cassader, M.; Pagano, G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. Ann Med. 2011;43(8):617-49.
82. Adams, L.A.; Sanderson, S.; Lindor, K.D.; Angulo, P. The histological course of non-alcoholic fatty liver disease: A longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. J. Hepatol. 2005; 42:132–138.
83. El-Serag, H.B.; Tran, T.; Everhart, J.E. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2004;126:460–468.
84. Hamaguchi, M.; Kojima, T.; Takeda, N.; Nakagawa, T. et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. Ann. Intern. Med. 2005;143:722–728.
85. Porepa, L.; Ray, J.G.; Sanchez-Romeu, P.; Booth, G.L. Newly diagnosed diabetes mellitus as a risk factor for serious liver disease. CMAJ 2010; 182: E526–E531.
86. Seshasai,S.R., Kaptoge, S.,Thompson, A.;Di Angelet al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. N. Engl. J. Med. 2011; 364:829–841.
87. Wainwright P and Byrne CD. Bidirectional Relationships and Disconnects between NAFLD and Features of the Metabolic Syndrome. Int J Mol Sci. 2016; 17(3): 367
88. Day, C.P.; James, O.F. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? Gastroenterology 1998; 114: 842–845.
89. Tilg, H., Moschen, A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. Hepatology 2010;52:1836–1846.
90. Polyzos, S.A. and Mantzoros, C.S. Leptin in health and disease: facts and expectations at its twentieth anniversary. Metabolism. 2015; 64: 5–12.
91. Magkos, F. and Mantzoros, C.S. Body fat redistribution and metabolic abnormalities in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy: novel insights into pathophysiology and emerging opportunities fo treatment.Metabolism.2011; 60: 749–7
92. Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2005; 115: 1343–1351

93. Mota M, Banini, B.A., Cazanave, S.C, and Sanyal, A.J. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2016; 65:1049–1061.
94. Caviglia, G.P., Rosso, C., Fagoonee, S., Saracco, G.M., and Pellicano, R. Liver fibrosis: the 2017 state of art. Panminerva Med. 2017; 59: 320–331.
95. Garcia-Ruiz, C.; Fernandez-Checa, J.C. Mitochondrial glutathione: Hepatocellular survival-death switch. J. Gastroenterol. Hepatol. 2006; 21: S3–S6.
96. Anderson, N.; Borlak, J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. Pharmacol. Rev. 2008; 60: 311–357.
97. Al Sharif, M.; Alov, P.; Vitcheva, V.; Pajeva, I.; Tsakovska, I. Modes-of-action related to repeated dose toxicity: Tissue-specific biological roles of PPARγ ligand-dependent dysregulation in nonalcoholic fatty liver disease. PPAR Res. 2014, 432647.
98. Mendez-Sanchez, N., Cruz-Ramon, V.C., Ramirez-Perez, O.L., Hwang, J.P., Barranco-Fragoso, B., and Cordova-Gallardo, J. New aspects of lipotoxicity in nonalcoholic steatohepatitis. Int J Mol Sci. 2018; 19
99. Polyzos, S.A., Kountouras, J., and Mantzoros, C.S. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. Minerva Endocrinol. 2017; 42: 92–108
100. Nati, M., Haddad, D., Birkenfeld, A.L., Koch, C.A., Chavakis, T., and Chatzigeorgiou, A. The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH*)*. Rev Endocr Metab Disord. 2016;17: 9–39.
101. Mahady, S.E. and George, J. Exercise and diet in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016; 65: 1172–1182
102. Wells, R.G. and Schwabe, R.F. Origin and function of myofibroblasts in the liver. Semin Liver Dis. 2015; 35: 97–106
103. Zhou, Z., Xu, M.J., Cai, Y., Wang, W., Jiang, J.X., Varga, Z.V. et al. Neutrophil-hepatic stellate cell interactions promote fibrosis in experimental steatohepatitis. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2018; 5: 399–413
104. Polyzos, S.A., Kountouras, J., and Mantzoros, C.S. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2016;65:1062–1079.
105. Boutari, C., Perakakis, N., and Mantzoros, C.S. Association of adipokines with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. Endocrinol Metab (Seoul). 2018; 33:33–43

106. Khaleel, E.F. and Abdel-Aleem, G.A. Obestatin protects and reverses nonalcoholic fatty liver disease and its associated insulin resistance in rats via inhibition of food intake, enhancing hepatic adiponectin signaling, and blocking ghrelin acylation. Arch Physiol Biochem. 2018;23:15-19
107. Souza, M.R.; Diniz Mde, F.; Medeiros-Filho, J.E.; Araujo, M.S. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. Arq. Gastroenterol. 2012; 49: 89–96.
108. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. J Hepatol 2012;57:141–149.
109. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. Nature 2014;510:84–91
110. Cantley JL, Yoshimura T, Camporez JP, Zhang D, Jornayvaz FR, Kumashiro N, et al. CGI-58 knockdown sequesters diacylglycerols in lipid droplets/ERpreventing diacylglycerol-mediated hepatic insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:1869–1874
111. Samuel, V.T.; Liu, Z.-X.; Wang, A.; Beddow, S.A.; Geisler, J.G.; Kahn, M.; Zhang, X.; Monia, B.P.; Bhanot, S.; Shulman, G.I. Inhibition of protein kinase Cε prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin. Investig. 2007;117:739–745.
112. Kumashiro, N.; Erion, D.M.; Zhang, D.; Kahn, M.; Beddow, S.A.; Chu, X.; Still, C.D.; Gerhard, G.S.; Han, X.; Dziura, J.; etal. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. PNAS 2011; 108:16381–16385.
113. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. Hepatology 2014;59: 713–723.
114. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. Trends Endocrinol Metab 2008;19:371–379
115. Kantartzis K, Machann J, Schick F, Fritsche A, Haring HU, Stefan N. The impact of liver fat vs. visceral fat in determining categories of prediabetes. Diabetologia 2010;53:882–889.
116. Targher G, Byrne CD. Nonalcoholic fatty liver disease: a novel cardiometabolic risk factor for type 2 diabetes and its complications. J Clin Endocrinol Metab 2013;98:483–495.

117. Ix JH, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. J Am Soc Nephrol 2010;21:406–412.

118. Bełtowski J. Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. Med Sci Monit 2003;9:RA55-61. 57.

119. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. Metabolism 2011;60:313-26.

120. Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat. Med .2002;8: 1288–1295.

121. Coppari R, Bjørbæk C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. Nat Rev Drug Discov 2012; 11: 692-708

122. Meek TH, Morton GJ. The role of leptin in diabetes: metabolic effects. Diabetologia 2016; 59: 928-932

123. Polyzos SA, Aronis KN, Kountouras J, Raptis DD, Vasiloglou MF, Mantzoros CS. Circulating leptin in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. Diabetologia 2016; 59: 30-43

124. López-Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, LópezLópez C, Martínez-Ortega J, Gómez-Rodríguez A, Triana-Cubillos S. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. Horm Mol Biol Clin Investig 2014; 8: 37-45

125. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2002;122: 274-280

126. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. Cytokine 2014;70: 11-20

127. Grigorescu M, Crisan D, Radu C, Grigorescu MD, Sparchez Z, Serban A. A novel pathophysiological-based panel of biomarkers for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. J Physiol Pharmacol 2012; 63: 347-353.

128. Abdou RM, Zhu L, Baker RD, Baker SS. Gut Microbiota of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Dig Dis Sci 2016;61:1268-1281

129. Machado MV, Cortez-Pinto H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. Int J Mol Sci 2016;17: 481

130. Abdou RM, Zhu L, Baker RD, Baker SS. Gut Microbiota of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Dig Dis Sci 2016; 61: 1268-1281

131. Croci I, Byrne NM, Choquette S, Hills AP, Chachay VS, Clouston AD, O'Moore-Sullivan TM, Macdonald GA, Prins JB, Hickman IJ. Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Gut 2013; 62: 1625-1633

132. Wieland A, Frank DN, Harnke B, Bambha K. Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther 2015; 42: 1051-1063

133. Chung GE, Kim D, Kwak MS, Yang JI, Yim JY, Lim SH, Itani M. The serum vitamin D level is inversely correlated with nonalcoholic fatty liver disease. Clin Mol Hepatol 2016; 22: 146-151.

134. Abenavoli L, Milic N, Luigiano C. Low 25-hydroxyvitamin D3 serum levels and non-alcoholic fatty liver disease. Minerva Med 2014; 105: 175.

135. Eliades M, Spyrou E. Vitamin D: a new player in non-alcoholic fatty liver disease? World J Gastroenterol 2015; 21: 1718-1727

136. George PS, Pearson ER, Witham MD. Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: a systematic review and meta-analysis. Diabet Med 2012; 29

137. Eliades M, Spyrou E, Agrawal N, Lazo M, Brancati FL, Potter JJ, Koteish AA, Clark JM, Guallar E, Hernaez R. Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther 2013; 38: 246-254

138. Angelico F, Silecchia G, Leonetti F, Fraioli A, Picardi A, Morini S, Cavallo MG. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. Hepatology 2012;56: 2180-2187

139. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, Reif S. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. Gut 2011; 60: 1728-1737

140. Marino L, Jornayvaz FR. Endocrine causes of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol 2015; 21: 11053-11076

141. Christou GA, Tselepis AD, Kiortsis DN. The metabolic role of retinol binding protein 4: an update. Hormone and Metabolic Research 2012;44:6-14.

142. Kotnik P, Fischer-Posovszky P and Wabitsch M. RBP4: a controversial adipokine. European Journal of Endocrinology.2011;165:703-11.

143. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes Nature. 2005;436:356-62.

144. Klöting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M, Kahn BB. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. Cell Metabolism.2007; 6, 79-87.

145. Friebe D, Neef M, Erbs S, Dittrich K, Kratzsch J et al. Role of retinol-binding protein 4 in the pathogenesis of Type 2 diabetes. Expert Review of Endocrinology & Metabolism. 2008; 3:161-173.

146. Norseen, J., Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, et al. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. Molecular and Cellular Biology. 2012;32:2010-9.

147. Lee D-C, Lee J-W, Im J-A. Association of serum retinol binding protein 4 and insulin resistance in apparently healthy adolescents. Metabolism 2007;56:327–31.

148. Friebe D, Neef M, ErbsS, et al. Retinol binding protein 4 (RBP4) is primarily associated with adipose tissue mass in children. Int J PediatrObes 2011; 6:e345–52. 11

149. Lambadiari V, Kadoglou NP, Stasinos V, at al. G. Serum levels of retinol-binding protein-4 are associated with the presence and severity of coronary artery disease. Cardiovasc Diabetol 2014;13:121

150. Pu L, Cheng J, Wu G, Yang H, et al. Effects of retinol binding protein 4 knockdown on the PI3K/Akt pathways in porcine adipocytes. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2013;29:447–57

151. Cai H , Lu S, Chen Y, Das Mbbs Mrcog S et al. Serum retinol binding protein 4 and galectin-3 binding protein as novel markers for postmenopausal nonalcoholic fatty liver disease. Clin Biochem. 2018;56:95-101.

152. Fujita T Role of retinol binding protein 4 in hepatic steatosis. Hepatology. 2014;59(6):2422. doi: 10.1002/hep.26759.
153. Chen X, Shen T, Li Q, Chen X, Li Y et al. Retinol Binding Protein-4 Levels and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A community-based cross-sectional study. Sci Rep. 2017: 23;7:45100.
154. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P. Cheme in activation by serine proteases of the coagulation fibrinolytic, and inflammatory cascades. J Biol Chem.2005;280:34661–34666.
155. Meder W, Wendland M, Busmann A, Kutzleb C, Spodsberg N, John H, et al. Characterization of human circulating TIG2 aligand for the orphan receptor ChemR23.FEBSLett. 2003;555:495–499.
156. Wanninger J, Bauer S, Eisinger K, et al. Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver. Mol Cell Endocrinol 2012; 349: 248-254
157. Roman A, Parlee S, Sinal C. Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. Endocrine 2012;42:243-251
158. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Murganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. J Biol Chem 2003;282:28175-28188.
159. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin:at the crossroads of inflammation and obesity. Trends Endocrinol Metab.2010;21:660–667.
160. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, et al. Chemerin is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. Endocrinology. 2007;148(10): 4687-94.
161. Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, et al. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population a pilot study. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2008;152: 217-221.
162. Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, Eren F, Ozdogan O,et al. Serum levels of omentin, chemerin and adipsin in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. Scand J Gasteroenterol. 2011;46:91.
163. Deng Y, Wang H, Lu Y, Liu S, Zhang Q, Huang J, Zhu R et al. Identification of chemerin as a novel FXR target gene down-regulated in the progression of nonalcoholic steatohepatitis. Endocrinology 2013;154:1794-801

164. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, et al. Chemerin is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. Endocrinology. 2007;148(10):4687-94.

165. Muruganandan S, Parlee SD, Rourke JL, Ernst MC, Goralski KB, et al. Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis. J BiolChem 2011;286:23982–23995.

166. Charlton, M.; Viker, K.; Krishnan, A. et al. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: New insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2009; 49:1375–1384

167. Deng Y, Wang H, Lu Y, Liu S, Zhang Q, Huang J, Zhu R et al. Identification of chemerin as a novel FXR target gene down-regulated in the progression of nonalcoholic steatohepatitis. Endocrinology 2013;154:1794-801

168. Fitzpatrick, E.; Dhawan, A. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: Current status anda glimpse of the future. World J. Gastroenterol. 2014; 20: 10851–10863

169. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2003;38:518–26.

170. Yang ZX, Lu CY, Yang YL, Dou KF and Tao KS: Lumican expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. Hepatogastroenterology 2013; 60: 349-353.

171. Nikitovic D, Papoutsidakis A, Karamanos NK, and Tzanakakis GN: Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. Matrix Biol 2014;35: 206-214.

172. Schaefer L, Raslik I, Grone HJ, Schonherr E, Macakova K, Ugorcakova J, Budny S, Schaefer RM, Kresse H. Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin. FASEB J 2001;15(3):559–561.

173. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352:1685-95

174. Brown DW, Giles WH, Croft JB: White blood cell count: an independent predictor of coronary heart disease mortality among a national cohort. J Clin Epidemiol 2001; 54: 3 16– 322.

175. Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Chiellini C, Maffei M, Grimaldi P, Bonino F, MoustaidMoussa N, Pasqualini F, Mantovani A, Ailhaud G, et al: Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells. J Lipid Res 2003;44:994-1000.

176. Fazzini F, Peri G, Doni A, Dell'Antonio G, Dal Cin E, Bozzolo E, D'Auria F, Praderio L, Ciboddo G, Sabbadini MG et al: PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. Arthritis Rheum 2001; 44:2841–2850.

177. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol 2000;227:271– 278.

178. Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D et al: Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. Circulation 2004; 1 10: 2 349–2354.

179. Muller B, Peri G, Doni A, Torri V, Landmann R, Bottazzi B, Mantovani A: Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. Crit Care Med 2001; 29:1404–1407.

180. Bevelacqua V, Libra M, Mazzarino MC, Gangemi P, Nicotra G, Curatolo S, Massimino D, Plumari A, Merito P, Valente G, et al: Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients. Int J Mol Med 2006; 1 8: 415–423.

181. Suzuki S, Takeishi Y, Niizeki T, Koyama Y, Kitahara T, Sasaki T, Sagara M, Kubota I: Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. Am Heart J 2008; 155: 7 5–81.

182. Matsubara J, Sugiyama S, Nozaki T, Sugamura K et al: Pentraxin 3 is a new inflammatory marker correlated with left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with normal ejection fraction. J Am Coll Cardiol 2011; 57: 861–869.

183. Karakas MF , Buyukkaya E , Kurt M , Motor S et al. Serum Pentraxin-3 Levels Are Associated with the Severity of Metabolic Syndrome. Med Princ Pract 2013;22:274–279.

184. Yoneda M, Uchiyama T, Kato S, Endo H et al**.** Plasma pentraxin3 is a novel marker for nonalcoholic steatohepatitis. BMC Gastroenterol. 2008; 8**:** 53**.**

185. Ozturk K, Kurt O, Dogan T, Ozen A et al. Pentraxin 3 Is a Predictor for Fibrosis and Arterial Stiffness in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Gastroenterology Research and Practice 2016;Volume 2016, Article ID 1417962, 7 pages http://dx.doi.org/10.1155/2016/1417962

186. Perbal B, Takigawa M. In: CCN proteins: a new family of cell growth and differentiation regulators. World Scientific Publishers, London 2005

187. Grünberg J, Hoffmann J, Hedjazifar S et al. Overexpressing the novel autocrine/endocrine adipokine WISP2 induces hyperplasia of the heart, white and brown adipose tissues and prevents insulin resistance. Scientific Reports 2017;7:43515

188. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T,et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. Diabetes. 2010;59:105–109

189. Gustafson, B., Hedjazifar, S., Gogg, S., Hammarstedt, A. & Smith, U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. Trends Endocrinol Metab.2015; 26: 193–200

190. Gustafson, B., Hammarstedt, A., Hedjazifar, S. & Smith, U. Restricted Adipogenesis in Hypertrophic Obesity The Role of WISP2, WNT, and BMP4. Diabetes.2013; 62:2997–3004

191. Sabbah, M. et al. CCN5, a novel transcriptional repressor of the transforming growth factor beta signaling pathway. Mol Cell Biol. 2011; 31:1459–1469

192. Lee MA, Li Y, Yang DK, Kho C, Oh JG, Hong G, Lee A et al. Matricellular Protein CCN5 Reverses Established Cardiac Fibrosis. J Am Coll Cardiol. 2016 Apr 5;67(13):1556-1568.

193. Mori K, Emoto M, Yokoyama H, et al. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type-2 diabetic and nondiabetic subject. Diabetes Care. 2006; 29: 468

194. Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Ari F, Oral AY et el. Serum fetuin A/alpha2HS-glycoprotein levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease: relation with liver fibrosis. Ann Clin Biochem.2010; 47: 549–553

195. Aronera S , St-Julesa D , Mukamalb K et al. Fetuin-A, glycemic status, and risk of cardiovascular disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Atherosclerosis. 2016; 248: 224–229

196. Dogru T, Genc H, Tapan S, Aslan F, Ercin CN, Ors F, Kara M, Sertoglu E, Karslioglu Y, Bagci S, Kurt I, Sonmez A. Plasma fetuin A is associated with endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. Clin Endocrinol (Oxf). 2013; 78:712–717.
197. Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y et al. Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. Liver Int. 2015; 35: 925–935.
198. Siddiq A, Lepretre F, Hercberg S, Froguel P, Gibson F. A synonymous coding polymorphism in the α2-Heremans-Schmid glycoprotein gene is associated with type 2 diabetes in French Caucasian. Diabetes 2005;54: 2477–2481.
199. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F et a. Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. Diabetes Care. 2006; 29: 853–857.
200. Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M, Cintron VJ, Qiang X, Goustin AS, Jen KL, Charron MJ, Jahnen-Dechent W, Grunberger G. Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. Diabetes. 2002; 51: 2450–2458.
201. Dasgupta S, Bhattacharya S, Biswas A, Majumdar SS, Mukhopadhyay S, Ray S, Bhatta-Charya S. NF-kB mediates lipid-induced fetuin-A expression in hepatocytes that impaires adipocyte function effecting insulin resistance. Biochem J. 2010; 429: 451–462.
202. Stefan N, Schick F, Haring H-U. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. N End J Med. 2014; 371: 2236–2237
203. Haukeland JW, Dahl TB, Yndestad A, Gladhaug IP, Loberg EM, Haaland T, Konopski Z, Wium C, Aasheim ET, Johansen OE, Aukrust P, Halvorsen B, Birkeland KI. Fetuin A in nonalcoholic fatty liver disease: in vivo and in vitro studies. Eur J Endocrinol. 2012; 166: 503– 510.
204. Dogru T, Genc H, Tapan S, Aslan F, Ercin CN, Ors F, Kara M, Sertoglu E, Karslioglu Y, Bagci S, Kurt I, Sonmez A. Plasma fetuin A is associated with endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. Clin Endocrinol. 2013;2:34-39
205. Kahraman A, Sowa JP, Schlattjan M, Sydor S, Pronadl M, Wree A, Beilfuss A, Kilicarslan A, Altinbas A, Bechmann LP, Syn WK, Gerken G,

Canbay A. Fetuin-A mRNA expression is elevated in NASH compared with NAFL patients. Clin Sci (Lond) 2013;125: 391–400.

206. Reinehr T, Roth CL. Fetuin A and its relations to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93: 4479–4485.

207. Malin SK, Mulya A, Fealy CE, Haus JM, Pagadala MR, Scelsi AR, Huang H, Flask CA, McCullough AJ, Kirwan JP. Fetuin-A is linked to improved glucose tolerance after short-term exercise training in nonalcoholic fatty liver disease. J Appl Physiol. 2013;115:33-48.

208. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuroo M, Mangelsdorl DJ, Kliwer SA. Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. Mol Endocrinol. 2010; 24: 2050–2064.

209. Li H, Zhang J, Jia W. Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. Front Med. 2013; 7: 25– 30.

210. Zhang Y, Lei T, Huang JF, Wang SB, Zhou LL, Yang ZQ, Chen XD.The link between fibroblast growth factor 21 and sterol regulatory element binding protein 1c during lipogenesis in hepatocytes. Mol Cell Endocrinol 2011; 342: 41–47.

211. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N.Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. Biochim Biophys Acta 2000;1492: 203–206.

212. Fisher FM, Chui PC, Nasser IA, Popov Y, Cunniff JC, Lundasen T, Kharitonenkov A, Schuppan D, Flier JS, Maratos-Flier E. Fibroblast growth factor 21 limits lipotoxicity by promoting hepatic fatty acid activation in mice on methionine and choline-deficient diets. Gastroenterology. 2014; 147: 1073–1083.

213. Li H, Zhang J, Jia W.Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. Front Med 2013;**7**: 25– 30.

214. Reinehr T, Woelfle J, Wunsch R, Roth CL.Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and its relation to obesity, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver in children: a longitudinal analysis. J Clin Endocrinol Metab 2012;97: 2143–2150.

215. Giannini C, Feldstein AE, Santoro N, et al. Circulating levels of FGF-21 in obese youth: associations with liver fat content and markers of liver damage. J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: 2993–3000.

216. Li H, Dong K, Fang Q, Hou X, Zhou M et al. High serum level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of non-alcoholic fatty liver disease: a 3-year prospective study in China. J Hepatol 2013;58: 557–563.

217. Tanaka N, Takahashi S, Zhang Y, Krausz KW, Smith PB, Patterson AD, Gonzalez FJ. Role of fibroblast growth factor 21 in early stage of NASH induced by methionine- and choline-deficient diet. Biochim Biophys Acta 2015;1852: 1242–1252.

218. Shen J, Chan HL, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Chan HY, Chim AM, Yeung DK, Chan FK, Woo J, Yu J, Chu WC, Wong VW. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. J Hepatol 2012;56: 1363–1370

219. Hui E, Xu A, Yang HB, Lam KSL. Obesity as the common soil of non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: role of adipokines. J Diabetes Investig 2013;4: 413–425

220. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos- Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR alpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. Cell Metab 2007; 5: 426–437.

221. Xu J, Lloyd DJ, Hale C. Stanislaus S, Chen M, Sivits G et al.Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. Diabetes 2009;58: 250–259.

222. Hui E, Xu A, Yang HB, Lam KSL. Obesity as the common soil of non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: role of adipokines. J Diabetes Investig. 2013; 4: 413–425.

223. Liu J, Xu Y, Hu Y, Wang G. The role of fibroblast growth factor 21 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and implications for therapy. Metabolism. 2015; 64: 380–390.

224. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR alpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. Cell Metab. 2007;5: 426–437.

225. Gaich G, Chien JY, Fu H, Glass LC, et al. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. Cell Metab. 2013;18(3):333-40.

226. Oike Y, Kasunaga K, Ito Y, Matsumoto S, Maekawa H et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling and regeneration. Proc Natl Acad Sci .2003;100: 9494–9499.
227. Ebert T, Bachmann A, Losser U, Kratzsch J et al. Serum levels of angiopoietin-relatef growth factor in diabetes mellitus and chronic hemodialysis. Metabolism 2009;58: 547–551.
228. Namkung J, Koh SB, Kong ID, Choi J-W, Yeh B-I. Serum levels of angiopoietin-related growth factor are increased in metabolic syndrome. Metabolism. 2011; 60: 564–568.
229. Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hishinua T, Hashimoto S.Angiopoietin-related growth factor suppresses gluconeogenesis through the Akt/Forkhead box class 01-dependent pathway in hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 2007; 323: 787–790
230. Khan MS, Knowles BB, Aden DP, Rosner W .Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line J Clin Endocrinol Metab 1981;53: 448–449
231. Peter A, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Staiger H, Machicao F, Schleicher E, Fritsche A, Haring H-U, Stefan N. Relationship of circulation sex-hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. Diabetes. 2010;59: 3167–3173.
232. Lazo M, Zeb I, Nasir K, Tracy RP, Budoff MJ, Ouyang P, Vaidya D. Association between endogenous sex hormones and liver fat in a multiethnic study of atherosclerosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2015;13: 1686–1693.
233. Polyzos SA, Kountouras J, Tsatsoulis A, Zafeiriadou E, Katsiki E, Patsiaoura K, Zavos C, Anastasiadou VV, Slavakis A. Sex steroids and sex hormone-binding globulin in postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. Hormones (Athens). 2013;12: 405–416
234. Hua X, Sun Y, Zhong Y, Feng W, Huang H, Wang W, Zhang T, Hu Y Low serum sex hormone-binding globulin is associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. Clin Endocrinol (Oxf) 2014;80: 877–88
235. Stefan N, Schick F, Haring H-U. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes. N Eng J Med. 2009; 361: 2675–2676.
236. Shin JY, Kim S-K, Lee MY, Kim HS et al. Serum sex hormone-binding globulin levels are independently associated with nonalcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2011; 94: 156–162.

237. Fletcher-Mors M, Schick A, Oeztuerk S, Haenle MM et al. Associations of fatty liver disease and other factors affecting serum SHBG concentrations: a population based study on 1657 subjects. Horm Metab Res. 2014; 46: 287– 293.

238. Bonnet F, Valayoudom Cephise FL, Gautier A et al. Role of sex steroids, intrahepatic fat and liver enzymes in the association between SHBG and metabolic features. Clin Endocrinol 2013; 79: 517–52.

239. Bonnet F, Valayoudom Cephise FL, Gautier A, Dubois S et al. Association between SHBG and metabolic features. Clin Endocrinol. 2013; 80: 523–533.

240. Simo R, Saez-Lopez C, Lecube A, Hernandez C, Fort JM, Selva DM. Adiponectin upregulates SHGB production: molecular mechanisms and potential implication. Endocrinology 2014; 155: 2820–2830.

241. Peter A, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Staiger H, Machicao F, Schleicher E, Fritsche A, Haring H-U, Stefan N. Relationship of circulation sex-hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. Diabetes 2010;59: 3167–3173.

242. Cui J, Chen CH, Lo MT, Schork N, Bettencourt R, Gonzalez MP, et al. Shared genetic effects between hepatic steatosis and fibrosis: a prospective twin study. Hepatology 2016;64:1547- 1558.

243. Chamoun,Z.;Vacca,F.;Parton,R.G.;Gruenberg,J.PNPLA3/adiponutrinfunctionsinlipiddropletformation. Biol. Cell 2013; 105: 219–233.

244. Romeo, S. ,Kozlitina, J., Xing, C.; Pertsemlidis, A.; Cox, D.; Pennacchio, L.A.; Boerwinkle, E.; Cohen, J.C.; Hobbs,H.H.Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat. Genet. 2008; 40: 1461–1465.

245. Romeo, S.; Sentinelli, F.; Dash, S.; Yeo, G.S.; Savage, D.B. et al. Morbid obesity exposes the association between PNPLA3I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. Int. J. Obes. 2010; 34:190–194.

246. Romeo, S.; Sentinelli, F.; Cambuli, V.M.; Incani, M.; Congiu, T.; Matta, V.; Pilia, S.; Huang-Doran, I.; Cossu, E.; Loche, S.; et al. The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. J. Hepatol. 2010; 53: 335–338.

247. Feitosa MF, Wojczynski MK, North KE, et al. The ERLIN1-CHUK-CWF19L1 gene cluster influences liver fat deposition and hepatic inflammation in the NHLBI Family Heart Study. Atherosclerosis 2013; 228:175-80.

248. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. PLoS One 2012;7:e38322

249. Holmen OL, Zhang H, Fan Y, et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. Nat Genet 2014; 46:345-51.

250. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 2005;115: 1343-51.

251. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. PLoS Genet 2011;7 :e1001324.

252. Speliotes, E.K., et al., PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. Hepatology. 2010; 52(3): 904-12.

253. Pingitore, P., et al., Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its I148M mutation results in loss of function. Biochim Biophys Acta. 2014; 1841: 574-80.

254. Aragones G, Auguet T, Armengol S, et al. PNPLA3 expression is related to liver steatosis in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. Int J Mol Sci 2Int J Mol Sci. 2016; 17(5): 630.

255. Pirazzi, C., et al., PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. Hum Mol Genet, 2014; 23(15): 4077-85.

256. He S, McPhaul C, LietalJ.Z. Asequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. The Journal of Biological Chemistry. 2010;285: 6706–6715.

257. Ruhanen H ,Perttila J.D, Holtta-Vuorietal M.D. PNPLA3 mediates hepatocyte triacylglycerol remodeling. Journal of Lipid Research. 2014;55:739–746.

258. Dai G, Liu P, Li X, Zhou X,et al. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) susceptibility and severity A meta-analysis Medicine (Baltimore). 2019; 98(7): e14324

259. Tai CM, Huang CK, Tu HP, et al. Interactions of a PPARGC1A variant and a PNPLA3 variant affect nonalcoholic steatohepatitis in severely obese Taiwanese patients. Medicine (Baltimore) 2016;95:e3120.

260. Fan JH, Xiang MQ, Li QL, et al. PNPLA3 rs738409 polymorphism associated with hepatic steatosis and advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis c virus: a meta-analysis. Gut Liver 2016;10:456–63

261. Kantartzis K, Peter A, Machicao F, et al. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. Diabetes 2009;58:2616–23.

262. Sookoian, S, Pirola, C.J. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2011, 53, 1883–1894.

263. Shen, J.-H, Li, Y.-L, Li, D, Wang, N.-N et al. The rs738409 (I148M) variant of the PNPLA3 gene and cirrhosis: A meta-analysis. J. Lipid Res. 2015; 56: 167–175.

264. Trépo E, Nahon P,Bontempi G, Valenti L, Falleti E, Nischalke, H.D, Hamza, S, Corradini, S.G, Burza, M.A, Guyot, E,et al. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. Hepatology 2014; 59: 2170–2177.

265. Speliotes, E.K., et al., PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. Hepatology. 2010; 52(3): 904-12

266. Valenti, L., et al., I148M patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2010; 52(4):1274-80.

267. Zhou, Y.; Llaurado, G.; Oresic, M.; Hyotylainen, T.; Orho-Melander, M.; Yki-Jarvinen, H. Circulating triacylglycerol signatures and insulin sensitivity in NAFLD associated with the E167K variant in TM6SF2. J. Hepatol. 2015; 62: 657–663.

268. Krawczyk, M., P. Portincasa, and F. Lammert, PNPLA3-associated steatohepatitis: toward a gene-based classification of fatty liver disease. Semin Liver Dis, 2013; 33(4):369-79.

269. Hyysalo J, Männistö VT, Zhou Y, et al. A population-based study on the prevalence of NASH using scores validated against liver histology[J]. J Hepatol, 2014; 60(4): 839–846.

270. Petta, S., et al., PNPLA3 GG genotype and carotid atherosclerosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. PLoS One, 2013. 8(9): p. e74089.

271. Musso, G., M. Cassader, and R. Gambino, PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 gene variants affect renal disease and function in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 2015; 62(2): 658-9.

272. Donati B,MottaBM,Pingitore P,etal.Thers2294918E434K variant modulates patatin-like phospholipase domain-containing 3 expression and liver damage[J]. Hepatology, 2016; 63 (3): 787–798.

273. Mahdessian, H.; Taxiarchis, A.; Popov, S.; Silveira, A.; Franco-Cereceda, A.; Hamsten, A.; Eriksson, P.; van't Hooft, F. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. PNAS 2014; 111: 8913–8918.

274. Kozlitina, J.; Smagris, E.; Stender, S.; et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat. Genet. 2014; 46: 352–356.

275. Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C[J]. Hepatology, 2011; 53(3): 791–799

276. Barbara M, Andrea Scott A, Alkhouri N. New insights into genetic predisposition and novel therapeutic targets for nonalcoholic fatty liver disease. HepatoBiliary Surg Nutr 2018;7(5):372-381

277. Danford C, Yao Z, Jiang ZG. Non-alcoholic fatty liver disease: a narrative review of genetics. The Journal of Biomedical Research, 2018 32(6): 389–400

278. Mahdessian, H., et al., TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014; 111(24):8913-8.

279. Liu, Y.L., et al., TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Nat Commun, 2014. 5: p. 4309.

280. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nat Commun, 2014; 5: 4309.

281. Do R, Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Gao C et al. Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. Nat Genet. 2013; 45(11):1345–1352.

282. Morris AP, Spencer CC, Tobin MD et al.; Wellcome Trust Case Control Consortium; Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium

(MAGIC) Investigators; Genetic Investigation of ANthropometric Traits (GIANT) Consortium; Asian Genetic Epidemiology Network– Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium; South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium; DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium (2012) Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. Nat Genet 2012;44(9):981–990. 11.

283. Saxena R, Elbers CC, Guo Y, Peter I, et al.; Look AHEAD Research Group; DIAGRAM consortium. Largescale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci. Am J Hum Genet 2012;90:410–425.

284. Holmen OL, Zhang H, Fan Y, et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. Nat Genet 2014;46:345-51

285. Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S, et al. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:8913-8.

286. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. Hepatology 2015;61:506-14.

287. Sookoian, S.; Castano, G.O.; Scian, R.; Mallardi, P.; Fernandez Gianotti, T.; Burqueno, A.L.; San Martino, J.; Pirola, C.J. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. Hepatology 2015; 61: 515–525.

288. Liu, Y.L.; Reeves, H.L.; Burt, A.D.et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Nat. Commun. 2014; 5: 4309.

289. Pirola, C.J.; Sookoian, S. The dual and opposite role of the TM6SF2-rs58542926 variant in protecting against cardiovascular disease and conferring risk for nonalcoholic fatty liver: A meta-analysis. Hepatology 2015; 62: 1742–1756.

290. Loomba R, Schork N, Chen CH, et al. Heritability of hepatic fibrosis and steatosis based on a prospective twin study[J]. Gastroenterology, 2015; 149: 1784–1793

291. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2018; 67: 328–357.

292. Nobili V, Donati B, Panera N, et al. A 4-polymorphism risk score predicts steatohepatitis in children with nonalcoholic fatty liver disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2014; 58: 632–636.

293. Eslam M, Hashem AM, Romero-Gomez M, et al. FibroGENE: A gene-based model for staging liver fibrosis. J Hepatol. 2016; 64(2): 390–398.

294. Zhou JH, Cai JJ , She ZG, Li HL. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. World J Gastroenterol. 2019; 21:1307-1326.

295. Lonardo A, Targher G. NAFLD: Is There Anything New under the Sun? .Int. J. Mol. Sci. 2017;18: 1955

296. Lebensztejn DM, Flisiak-Jackiewicz M, Białokoz-Kalinowska I, et al. Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease. Acta Biochim Pol. 2016;63:459-67.

297. McCullough, A. J. The epidemiology and risk factors of 25. NASH. – In: Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders. G. C. Farrell, J. George, P. Hall, A. J. McCullough (Eds.). Oxford: Blackwell Publishing. 2005;34: 23-37

298. Kotnik, P., et al.. RBP4: a controversial adipokine. *European Journal of* Endocrinology. 2011;165:703-11.

299. Klöting, N., et al. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. Cell Metabolism. 2007; 6: 79-87.

300. Takebayashi, K., et al. Role of retinol-binding protein 4 in the pathogenesis of Type 2 diabetes. Expert Review of Endocrinology & Metabolism,2008; 3, 161-173

301. Yang, Q., et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. Nature. 2005;436: 356-362.

302. Park, H. et al. Association between serum retinol-binding protein 4 concentrations and clinical indices in subjects with type 2 diabetes: A meta-analysis. Journal of Human Nutrition and Dietetics. 2012;25, 300–10.

303. Tabesh, M. Association of retinol-binding protein 4 with metabolic syndrome in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. Journal of Research in Medical Sciences. 2017; 22: 28.

304. Tabesh, Luft, V.C., et al.. Retinol binding protein 4 and incident diabetes--the Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC Study). Brazilian journal of epidemiology. 2013;16,: 388-97.

305. Norseen, J., et al. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. Molecular and Cellular Biology. 2012; 32: 2010-9.

306. Luft F, Cai H, et al.. Serum retinol binding protein 4 and galectin-3 binding protein as novel markers for postmenopausal nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical* Biochemistry. 2018;56: 95-101.

307. Doycheva I, Patel N, Peterson M et al. Prognostic implication of liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease in diabetes. J Diabetes Complications. 2013;27:293-300

308. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94:5155–5162.

309. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. Hepatology 2009; 50:957-69

310. Doke S, Lock JF, Birkenfeld AL, Hoppe S et al. Elevatet hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease. Eur J Endocrinol 2013;169:574-57.

311. Habib S, Eshki A, Altassan B, Fatani D, Helmi H, Alsaif S. Relationship of serum novel adipokinechemerin levels with body composition, insulin resistance, dyslipidemia and diabesity in Saudi women. EurRevMedPharmacolSci 2017; 21: 1296-1302.

312. Kralisch S, Weise S, Sommer G, Lipfert J, Lossner U, et al. Interleukin1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. Regul Pept 2009;154:102–106.

313. Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor-{alpha}. Endocrinology 2010;151: 2590–2602.

314. Li Y, Shi B, Li S. Association between serum chemerin concentration and clinical indices in obesity or metabolic syndrome: a meta-analysis. PLoS One 2014; 9: 12.

315. Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrighs A, Arner, P, at al. Chemerin Is a Novel Adipocyte-Derived Factor Inducing Insulin Resistance in Primary Human Skeletal Muscle Cells.Diabetes. 2009;58:2731-40.
316. Napoleone E, Di Santo A, Bastone A et al., “Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation,” Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol.22,no.5,pp.782–787,2002.
317. Matsui S, Ishii J, Kitagawa F et al., “Pentraxin 3 in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction,” Atherosclerosis,2010;210:220–225.
318. Maleki I, Rastgar A, Hosseinietal V. Highsensitive CRPand pentraxine 3 as noninvasive biomarkers of nonalcoholic fatty liverdisease. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2014;8:1583–1590.
319. Zanetti M, Bosutti A, Ferreira C, Vinci P, et al. Circulating pentraxin 3 levels are higher in metabolic syndrome with subclinical atherosclerosis: evidence for association with atherogenic lipid profile. Clin Exp Med 2009;9:243-248
320. Karakas MF, Buyukkaya E, Kurt M, Motor S, et al. Serum pentraxin-3 levels are associated with the severity of metabolic syndrome. Med Princ Pract. 2013;22:274-9.
321. Hammarstedt, A. et al. WISP2 regulates preadipocyte commitment and PPARgamma activation by BMP4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013;110: 2563–2568
322. Dahlman, I. et al. Functional annotation of the human fat cell secretome. Arch Physiol Biochem 2012;118:84–91.
323. Sabbah, M. et al. CCN5, a novel transcriptional repressor of the transforming growth factor beta signaling pathway. Mol Cell Biol 2011;31:1459–1469.
324. Jiang S, Yan C, Fang QC, Shao ML et al. Fibroblast growth factor 21 is regulated by the IREα-XBP1 branch of the unfolded protein response and counteracts endoplasmic reticulum stress-induced hepatic steatosis. J Biol Chem 2014;289: 29751–2976
325. Kim SH, Kim KH, Kim H-K, Kim M-J et al. Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress. Diabetologia 2015;58:809–818.
326. Lee J, Hong SW, Park SE, Rhee EJ, et al. Exendin-4 regulates lipid metabolism and fibroblast growth factor-21 in hepatic steatosis. Metabolism. 2014; 63: 1041–1048

327. Li H, Fang Q, Gao F, Fan J, Zjou J et al. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride J Hepatol 2010;53: 934–940

328. Yilmaz Y, Eren F, Yonal O, Kuty R et al. Increased serum FGF21 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Eur J Clin Invest . 2010;40:887–892.

329. Wang YS, Ye J, Cao YH, Zhang R, Liu Y et al. Increased serum/plasma fibroblast growth factor 21 in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Postgrad Med J.2019;5:134-139.

330. Chen W, Li L, Yang G, et al. Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnosed patients with type 2 diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008; 116(1):65–68.

331. Chavez A, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani M, et al. Circulating fibroblast growth factor 21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. Diab Care. 2009; 32(8):1542–1546.

332. Samms R, Lewis J, Norton L et al.FGF21 Is an Insulin-Dependent Postprandial Hormone in Adult Humans .J Clin Endocrinol Metab 2017; 102: 3806–3813

333. Hui E, Xu A, Yang HB, Lam KSL. Obesity as the common soil of non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: role of adipokines. J Diabetes Investig 2013; 4: 413–425

334. Liu J, Xu Y, Hu Y, Wang G. The role of fibroblast growth factor 21 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and implications for therapy. Metabolism. 2015; 64: 380–390.

335. Coskun T, Bina HA, Schneider MA et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. Endocrinology 2008;149: 6018–6027

336. Yafei S, Elsewy F, Youssef E, Ayman M, El-Shafei M. Fibroblast growth factor 21 association with subclinical atherosclerosis and arterial stiffness in type 2 diabetes. Diabetes Metab Syndr. 2019;13:882-888.

337. An S, Lee M, Yi S, Ha E, et al.Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery plaques. Diabetes Res Clin Pract. 2012; 96: 196-20

338. Y. Xiao, L. Liu, A. Xu, P. Zhou, Z. Long, Y. Tu, et al.Serum fibroblast growth factor 21 levels are related to subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. Cardiovasc Diabetol. 2015;14: 72

339. Mori K, Emoto M, Inaba MFetuin A: a multifunctional protein. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov. 2011;5: 124–14

340. Mori K, Emoto M, Inaba M. Fetuin A and the cardiovascular system. Adv Clin Chem. 2012;56: 175–195

341. Mori K, Emoto M, Yokoyama H, et al. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type-2 diabetic and nondiabetic subject. Diabetes Care. 2006; 29: 468

342. Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, et al. Angiopoietin-related growth factor antagonized obesity and insulin resistance. Nat Med 2005;11: 400–408

343. Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Matthews KA et al. Sex-hormone-binding globulin and the free androgen index are related to cardiovascular risk factor in multiethnic premenopausal and perimenopausel women enrolled in the Study of Women Across the Nation (SWAN). Circulation 2005;111: 1242–1249.

344. Dongiovanni P, Anstee QM, Valenti L. Genetic Predisposition in NAFLD and NASH: Impact on Severity of Liver Disease and Response to Treatment. Current Pharmaceutical Design. 2013;19:5219-5238.

345. Zhang L, You W, Zhang H, Peng R, et al. PNPLA3 polymorphisms (rs738409) and non-alcoholic fatty liver disease risk and related phenotypes: a meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol 2015; 30: 821-829

346. Basu Ray S, Wang Y, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116:9521-9526.

347. Palmer CNA, Maglio C, Pirazzi C, Burza MA, Adiels M, et al. Paradoxical Lower Serum Triglyceride Levels and Higher Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility in Obese Individuals with the PNPLA3 148M Variant. PLoS ONE 2012; 7(6): e39362. doi:10.1371

348. Giudice EM, Grandone A, Cirillo G, Santoro N, Amato A, Brienza C, Savarese P, Marzuillo P, Perrone L. The association of PNPLA3 variants with liver enzymes in childhood obesity is driven by the interaction with abdominal fat. PLoS One 2011; 6: e27933

349. Davis JN, Lê KA, Walker RW et al.. Increased hepatic fat in overweight Hispanic youth influenced by interaction between genetic variation in PNPLA3 and high dietary carbohydrate and sugar consumption. Am J Clin Nutr 2010; 92: 1522-1527

350. Santoro N, Savoye M, Kim G, Marotto K, Shaw MM, Pierpont B, Caprio S. Hepatic fat accumulation is modulated by the interaction between the rs738409 variant in the PNPLA3 gene and the dietary omega6/omega3 PUFA intake. PLoS One 2012; 7: e37827

351. Santoro N, Zhang CK, Zhao H, Pakstis AJ et al.. Variant in the glucokinase regulatory protein (GCKR) gene is associated with fatty liver in obese children and adolescents. Hepatology 2012; 55: 781-789

352. Valenti L, Alisi A, Nobili V. Unraveling the genetics of fatty liver in obese children: additive effect of P446L GCKR and I148M PNPLA3 polymorphisms. Hepatology 2012; 55: 661-663

353. Cui J, Chen CH, Lo MT, Schork N, Bettencourt R, Gonzalez MP, et al. Shared genetic effects between hepatic steatosis and fibrosis: a prospective twin study. Hepatology. 2016;64:1547- 1558.