

Νέος σύνθετος μη-επεμβατικός δείκτης πρόβλεψης της μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, βασισμένος σε ομοκυστεΐνη, SGOT και ΤΚΕ

Σ.Α. Πολύζος¹
Ι. Κουντουράς¹
Α. Σλαβάκης²
Ε. Ζαφειριάδου³
Κ. Πατσιαούρα⁴
Ε. Κατσιή⁴
Α. Παπαθεοδώρου⁵
Ε. Τέρπος⁶

¹ Β' Παθολογική Κλινική
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου
Θεσσαλονίκης, Ιπποκράτειο
Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης

² Βιοχημικό Εργαστήριο,
Ιπποκράτειο Νοσοκομείο
Θεσσαλονίκης

³ Ακτινολογικό Τμήμα,
Ιπποκράτειο Νοσοκομείο
Θεσσαλονίκης

⁴ Παθολογοανατομικό Τμήμα,
Ιπποκράτειο Νοσοκομείο
Θεσσαλονίκης

⁵ Τμήμα Ιατρικής Έρευνας,
251 Γενικό Νοσοκομείο Αθήνας

⁶ Τμήμα Κλινικής Θεραπευτικής,
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου
Αθηνών

Περίληψη

Σκοπός: Η διάκριση μεταξύ μη-αλκοολικής απλής ηπατοστεάτωσης (ΜΑΗ) και μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (ΜΑΣ) απαιτεί διενέργεια βιοψίας για ιστολογικό έλεγχο ήπατος. Η ανεύρεση μη-επεμβατικών δεικτών για τη ΜΑΣ αποτελεί διεθνώς αντικείμενο ευρείας έρευνας. Σκοπός της παρούσας πιλοτικής μελέτης ήταν η ανίχνευση ανεξάρτητων παραγόντων πρόβλεψης προς δημιουργία σύνθετου μη-επεμβατικού δείκτη πρόγνωσης της ΜΑΣ, για πρώτη φορά σε ελληνικό πληθυσμό.

Μέθοδοι: Συμπεριλήφθηκαν 30 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη μη-αλκοολική λιπώδη νόσο ήπατος (ΜΑΛΝΗ) [ΜΑΗ (n=15), ΜΑΣ (n=15)]. Οι ομάδες ήταν σταθμισμένες ως προς φύλο, ηλικία, δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) και περιφέρεια μέσης. Πριν τη διενέργεια ηπατικής βιοψίας, οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε σωματομετρική και κλινική εξέταση, αιμοληψία για προσδιορισμό πληθώρας παραμέτρων: αιματολογικών, βιοχημικών, σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό σιδήρου και ομοκυστεΐνης, δεικτών φλεγμονής, απόπτωσης και οξειδωτικού στρες, ορμονών και λιποκυτταροκινών, υπολογίσθηκαν δε οι δείκτες ινσουλινοαντίστασης. Εφαρμόσθηκε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση σε δύο επίπεδα, αρχικά για ξεχωριστή προσαρμογή των μεταβλητών ως προς φύλο, ηλικία και ΔΜΣ και, στη συνέχεια, για δημιουργία σύνθετου μοντέλου πρόβλεψης της ΜΑΣ, όπου οι μεταβλητές που παρείχαν σημαντικότητα στο προηγούμενο επίπεδο συνδυάστηκαν μεταξύ τους.

Αποτελέσματα: Από το σύνολο των εκτιμηθεισών παραμέτρων, οι γλουταμική-οξαλοξική τρανσαμινάση (serum glutamic oxaloacetic transaminase [SGOT], $p=0,027$), $\log(\text{TKE})$ ($p=0,034$) και ομοκυστεΐνη ($p=0,041$) προέβλεπαν την ύπαρξη ΜΑΣ ανεξάρτητα από ηλικία, φύλο και ΔΜΣ. Οι μεταβλητές αυτές εισήχθησαν στο σύνθετο μοντέλο πρόγνωσης της ΜΑΣ διχοτομημένες, ως εξής: ομοκυστεΐνη $< 12,5$ ή $\geq 12,5$ $\mu\text{mol/L}$, SGOT < 37 ή ≥ 37 U/L και ΤΚΕ < 20 ή ≥ 20 mm. Το μοντέλο αυτό παρείχε $R\text{-square}=0,563$ ($p=0,001$) και περιοχή κάτω από την καμπύλη $\text{ROC}=0,873 \pm 0,066$ ($p<0,001$), και εμφάνισε ευαισθησία, ειδικότητα, θετική (PPV) και αρνητική προγνωστική αξία (NPV) για πρόβλεψη ΜΑΣ 73,3%, 86,7%, 84,6% και 76,5%, αντίστοιχα. Και οι τρεις μεταβλητές εντός αυτού προέβλεπαν την ύπαρξη ΜΑΣ ανεξάρτητα από τις άλλες δύο. Ο σύνθετος αυτός δείκτης επονομάστηκε HSENSI (ακρωνύμιο των λέξεων Homocysteine, SGOT, Erythrocyte sedimentation rate, Nonalcoholic Steatohepatitis Index).

Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά την κλινική σημασία του δείκτη HSENSI, που φαίνεται να είναι σημαντική, επειδή το μοντέλο αυτό αποτελείται από τρεις εύκολα μετρήσιμες μεταβλητές. Παρόλα αυτά, πριν από την εισαγωγή του δείκτη στην κλινική πράξη, υπάρχει ανάγκη μεγαλύτερης μελέτης επαλήθευσης.

Εισαγωγή

Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (ΜΑΑΝΗ) (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) είναι μια χρόνια ηπατική νόσος με επιπολασμό 10-46% στον γενικό πληθυσμό¹. Νεκροτομική μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό ανέφερε επιπολασμό της ΜΑΑΝΗ 71,1%, ένα από τα υψηλότερα δημοσιευμένα ποσοστά παγκοσμίως². Η ΜΑΑΝΗ αποτελεί την πιο κοινή αιτία ηπατικής δυσλειτουργίας στην κλινική πράξη και η συχνότητά της είναι αυξανόμενη τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά κι εφήβους, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη συχνότητα παχυσαρκίας και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2)¹. Επίσης, η ΜΑΑΝΗ αποτελεί συχνό πρόβλημα σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία³. Η ΜΑΑΝΗ περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ηπατικής βλάβης, που εμπεριέχει τη μη-αλκοολική απλή ηπατοστεάτωση (ΜΑΗ), η οποία θεωρείται γενικώς καλοήθους πρόγνωσης, και τη μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα (ΜΑΣ), η οποία εξελίσσεται συχνότερα σε ηπατική κίρρωση (10-20%), ηπατική ανεπάρκεια και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα⁴.

Ο ιστολογικός έλεγχος του ήπατος κατόπιν ηπατικής βιοψίας αποτελεί σήμερα τη μέθοδο εκλογής (gold standard) για τη διάγνωση και σταδιοποίηση της ΜΑΑΝΗ σε όλες τις πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες⁵⁻⁷, επειδή προς το παρόν η βαρύτητα της ΜΑΑΝΗ δεν δύναται να εκτιμηθεί μόνο με απεικονιστικά ή βιοχημικά κριτήρια. Η διενέργεια ηπατικής βιοψίας είναι όμως επεμβατική μέθοδος, έχει δυνητικές επιπλοκές και είναι πρακτικά μη εφαρμόσιμη σε όλους τους ασθενείς με ΜΑΑΝΗ, λόγω του υψηλού επιπολασμού της νόσου. Επομένως, η προσπάθεια ανεύρεσης μη-επεμβατικών δεικτών (non-invasive markers) για τη ΜΑΣ, με δυνητικό σκοπό να αντικαταστήσουν μερικώς τον ηπατικό ιστολογικό έλεγχο ή να αποτελέσουν δείκτες διενέργειας βιοψίας ήπατος μόνο σε ασθενείς με ισχυρή υποψία ΜΑΣ, αποτελεί διεθνώς αντικείμενο εντατικής έρευνας⁸. Επιπλέον, τέτοιοι δείκτες πιθανόν να είναι χρήσιμοι στα πλαίσια επανελέγχου των ασθενών με ΜΑΑΝΗ, αποφεύγοντας τον επανειλημμένο

ιστολογικό έλεγχο, ο οποίος δυνατόν να μην είναι ιδιαίτερα ανεκτός από τους ασθενείς⁹.

Ο κύριος σκοπός της παρούσας πιλοτικής μελέτης ήταν η ανίχνευση ανεξάρτητων παραγόντων πρόβλεψης της ΜΑΣ για τη δημιουργία σύνθετου μη-επεμβατικού δείκτη πρόγνωσης της ΜΑΣ σε ελληνικό πληθυσμό.

Ασθενείς και μέθοδοι

Πρόκειται για μια πιλοτική διασταυρούμενη (cross-sectional) μελέτη. Ενήλικες ασθενείς με ΜΑΑΝΗ αξιολογήθηκαν και στρατεύτηκαν σε επίπεδο εξωτερικού ιατρείου μεταξύ Ιουνίου 2008 και Νοεμβρίου 2010. Κάθε ασθενής έδωσε τη συγκατάθεσή του για συμμετοχή μετά διεξοδική ενημέρωσή του. Το πρωτόκολλο της μελέτης ήταν σύμφωνο με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Στην αρχική επίσκεψη (screening) έγινε λήψη ιστορικού, κλινική εξέταση και δόθηκαν οι εργαστηριακές εκείνες δοκιμασίες που θα βοηθούσαν στην τελική επιλογή των ασθενών (υπερηχογράφημα ήπατος, λειτουργικές δοκιμασίες ήπατος). Κριτήρια εισόδου στη μελέτη ήταν: 1) ηλικία ≥ 18 έτη, 2) υπερηχογραφικώς λιπώδες (λάμπον) ήπαρ και αυξημένες τρανσαμινάσες ή/και γ -γλουταμυλτρανσφεράση (γ -glutamyl transferase, γ -GT) για τουλάχιστον 6 μήνες προ της βιοψίας και 3) συγκατάθεση του ασθενούς για βιοψία ήπατος.

Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν: 1) μέση λήψη αιθανόλης >20 g/day, 2) κίρρωση ήπατος, 3) ιστορικό άλλης ηπατικής νόσου (ιογενής ηπατίτιδα, αυτοάνοση ηπατίτιδα, φαρμακευτική ηπατίτιδα, αυτοάνοση χολαγγειίτιδα, πρωτοπαθής χολική κίρρωση, αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson και ανεπάρκεια α 1-αντιθρυψίνης), 4) σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, 5) παγκρεατίτιδα, 6) αρρυθμιστός υποθυρεοειδισμός ή υπερθυρεοειδισμός, 7) επινεφριδιακή ανεπάρκεια, 8) νεφρική ανεπάρκεια, 9) θρομβοφιλία ή άλλες διαταραχές τουπηκτικού μηχανισμού, 10) οποιοδήποτε τύπου καρκίνος, 11) κύηση, 12) πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, 13) πρόσφατη (εντός 1 μηνός από τη στρατολόγηση) λοίμωξη (ιογενής, βακτηριδιακή), 14) εθισμός σε οποιοδήποτε φάρμακο, 15) παρεντερική διατροφή ή ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης εντός 1 μηνός από τη στρατολόγηση και 16) χρήση κάποιου από τα ακόλουθα φάρμακα εντός περιόδου 12 μηνών από τη στρατολόγηση: οιστρογόνα,

προγεστερόνη, γλυκοκορτικοειδή, θειαζολιδινεδιόνες, ινσουλίνη, σιμπουτραμίνη, ορλιστάτη, ριμόναμπαντ, βιταμίνη Ε, βιταμίνη C, βιταμίνη Β12, φυλλικό οξύ, αρκτοδοεξυχολικό οξύ, σουλφασαλαζίνη, σίδηρος, ιντερφερόνη, ταμοξιφένη, αμιοδαρόνη, οποιοσδήποτε βιολογικός παράγοντας, οποιοδήποτε αντιβιοτικό, οποιοδήποτε αντιφυματικό, αντιεπιληπτικό ή αντι-ικό φάρμακο, φάρμακα που επηρεάζουν την αιμόσταση, όπως αντιαιμοπεταλιακά, ασπιρίνη και αντιπηκτικά.

Μετά την επιλογή κάθε ασθενούς ως κατάλληλου για τη μελέτη, ακολούθησε η βασική επίσκεψη, όπου έγινε κλινικός και σωματομετρικός έλεγχος, καθώς και αιμοληψία. Η αιμοληψία γινόταν το πρωί (8-9 π.μ.) μετά 12ωρη νηστεία, 1-2 ώρες πριν την ηπατική βιοψία, η οποία γινόταν από εξειδικευμένη ακτινολόγο (ΕΖ), υπό καθοδήγηση από αξονικό τομογράφο. Ο ιστολογικός έλεγχος του ήπατος γινόταν από δύο εξειδικευμένες παθολογοανατόμους (ΚΠ, ΕΚ). Ο ακτινολόγος και οι παθολογοανατόμοι δεν γνώριζαν στοιχεία του ιστορικού και του κλινικοεργαστηριακού ελέγχου του (blinded). Για τον ιστολογικό έλεγχο του ήπατος χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ιστολογικής ταξινόμησης NAFLD Activity Score (NAS)¹⁰, το οποίο αποτελεί το πιο σύγχρονο σύστημα σταδιοποίησης των ασθενών με ΜΑΛΝΗ.

Εντός μίας ώρας από την αιμοληψία της βασικής επίσκεψης μετρήθηκαν τα εξής:

1) Γενική αίματος (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, πολυμορφοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα, μονοπύρρηνα, αιμοπετάλια)

2) Βιοχημικός έλεγχος [γλουταμική-οξαλοξική τρανσαμινάση (serum glutamic oxaloacetic transaminase, SGOT), γλουταμική-πυρουβική τρανσαμινάση (serum glutamic pyruvic transaminase, SGPT), γ-GT, αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase ALP), ολική και άμεση χολερυθρίνη, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλη (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C), ουρικό οξύ, ουρία, κρεατινίνη, κάλιο, νάτριο, γαλακτική δεϋδρογονάση (lactate dehydrogenase, LDH), φωσφοκινάση κρεατινίνης (creatine phosphokinase, CPK), γλυκόζη, σίδηρος]

3) Δείκτες φλεγμονής [ταχύτητα καθίζησης ερυθρών στη 1 h (ΤΚΕ) και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP)]

4) Δραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου (reactive oxygen metabolites, ROMs), ως δείκτες οξειδωτικού στρες, οι οποίοι μετρήθηκαν εντός 5 λεπτών από την αιμοληψία.

Επιπλέον, δείγματα ορού (4 ξεχωριστά aliquots

ανά ασθενή) καταψύχθηκαν άμεσα στους -30°C και διατηρήθηκαν για μέτρηση των ακόλουθων παραμέτρων, που έγινε για όλους τους ασθενείς μαζί στο τέλος της μελέτης:

5) Ομοκυστεΐνη, φυλλικό οξύ, βιταμίνη Β12, φερριτίνη

6) Δείκτες πολλαπλασιασμού και απόπτωσης [Α1-εμβρυϊκή σφαιρίνη (α -fetoprotein, AFP), κυτοκερατίνη (cytokeratin, CK)-18]

7) Ινσουλίνη, κορτιζόλη και ορμόνες φύλου [δεσμεύουσα τις ορμόνες του φύλου σφαιρίνη (sex hormone-binding globulin, SHBG), τεστοστερόνη, οιστραδιόλη, θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη (dehydroepiandrosterone sulfate, DHEAS)]

8) Λιποκυτταροκίνες/κυτταροκίνες [ολική και υψηλού μοριακού βάρους (high molecular weight, HMW) αδιπονεκτίνη, βισφατίνη, παράγοντας νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor, TNF)- α]

Η γενική αίματος και ο βιοχημικός έλεγχος εκτιμήθηκαν με αυτόματους αναλυτές (Beckman Coulter LH 750, Nyon, Switzerland και Olympus AU2700, Olympus, Hamburg, Germany, αντίστοιχα) με τη χρήση καθιερωμένων μεθόδων. Η ΤΚΕ εκτιμήθηκε επίσης με αυτόματο αναλυτή (Ves Matic 20, Menarini Diagnostics, Rungis, France) με τη χρήση καθιερωμένης μεθόδου.

Η CRP εκτιμήθηκε με μέθοδο ανοσοανεφελομετρίας και τη χρήση του αυτόματου αναλυτή BN II (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) με ειδικό kit της ίδιας εταιρείας, της οποίας ο ολικός coefficient of variation (CV) ήταν 4,5%.

Η μέτρηση ROMs εκτιμήθηκε με μέθοδο της σπεκτροφωτομετρίας και τη χρήση του αυτόματου αναλυτή Free Radical Analytical System (FRAS)-3 (Diacron International, Grosseto, Italy) με το kit d-ROMs της ίδιας εταιρείας. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει το ολικό οξειδωτικό στρες, μετρώντας στο πλάσμα ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όπως υδροϋπεροξειδία, τα οποία είναι ενδιάμεσα παράγωγα κυτταρικής υπεροξειδωσης (respiratory or oxidative burst). Οι μονάδες μέτρησης είναι οι UCarr με αντιστοιχία 1 UCarr = 0.8 mg/L H_2O_2 . Οι CV εντός (intra-assay) και μεταξύ (inter-assay) της μεθόδου ήταν 2,1% και 3,1%, αντίστοιχα.

Η μέτρηση της AFP έγινε με μέθοδο ανοσοχημειοφωταύγειας (ICLA) και τη χρήση του αυτόματου αναλυτή ADVIA Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) με ειδικό kit της ίδιας εταιρείας, το οποίο είχε CV εντός (intra-assay) και μεταξύ (inter-assay) της μεθόδου 2,0-4,4% και 2,7-4,0%, αντίστοιχα.

Οι μετρήσεις ομοκυστεΐνης, φυλλικού οξέος, βιταμίνης B12 και φερριτίνης εκτιμήθηκαν επίσης με μέθοδο ανοσοχημειοφωταύγειας (ICLA) και τη χρήση του αυτόματου αναλυτή ADVIA Centaur CP (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) με ειδικά kits της ίδιας εταιρείας. Οι CV εντός (intra-assay) και μεταξύ (inter-assay) των μεθόδων ήταν αντίστοιχα για την ομοκυστεΐνη 2,3-4,4% και 1,5-5,2%, το φυλλικό οξύ 4,5-7,9% και 5,3-7,2%, τη βιταμίνη B12 2,4-5,0% και 2,7-9,2% και τη φερριτίνη 2,1-3,0% και 2,7-5,4%.

Οι μετρήσεις ινσουλίνης, SHBG, τεστοστερόνης, οιστραδιόλης, κορτιζόλης και DHEAS εκτιμήθηκαν με μέθοδο ανοσοχημειοφωταύγειας (ICLA) και τη χρήση του αυτόματου αναλυτή Immulite 2500 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) με ειδικά kits της ίδιας εταιρείας. Οι εντός (intra-assay) και ολικοί CV των μεθόδων ήταν αντίστοιχα για την ινσουλίνη 3,3-5,5% και 4,1-7,3%, τη SHBG 2,4-4,4% και 3,7-7,0%, την τεστοστερόνη 5,1-11,7% και 7,2-13,0%, την οιστραδιόλη 4,3-9,9% και 6,7-16,0%, την κορτιζόλη 5,2-7,4% και 7,2-9,4% και τη DHEAS 4,9-9,8% και 7,9-13,0%.

Οι μετρήσεις ολικής και HMW αδιπονεκτίνης, βισφατίνης, TNF- α και CK-18 εκτιμήθηκαν με μέθοδο ELISA και τη χρήση του αυτόματου αναλυτή ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA) με kits διαφορετικών εταιρειών ως ακολούθως: 1) ολική αδιπονεκτίνη: adiponectin human ELISA kit (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany), 2) HMW αδιπονεκτίνη: adiponectin multimeric ELISA kit (ALPCO Immunoassays, Salem, NH, USA), 3) βισφατίνη: visfatin human C-terminal ELISA kit (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany), 4) TNF- α : TNF- α human ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) και 5) CK-18: M30-Apoptosis ELISA kit (PEVIVA, Bromma, Sweden). Οι CV εντός (intra-assay) και μεταξύ (inter-assay) των μεθόδων ήταν αντίστοιχα για την ολική αδιπονεκτίνη 5,0% και 6,0%, την HMW αδιπονεκτίνη 3,3-5,0% και 5,7%, τη βισφατίνη 5,6% και 7,0%, τον TNF- α 4,2-5,2% και 4,6-7,4% και την CK-18 3,1% και 5,2%. Επισημαίνεται ότι το περιγραφόμενο στην παρούσα μελέτη ως «CK-18» που εκτιμάει ουσιαστικά το προαναφερθέν M30-Apoptosis ELISA kit είναι το αντιγόνο M30 που αποκαλύπτεται μετά την αποκοπή από τις κασπάσες του καρβοξυτελικού άκρου της CK-18. Η CK-18 και κατ'επέκταση το αντιγόνο M30 εμφανίζουν υψηλή ηπατική ειδικότητα και έχουν συ-

σχετισθεί με την ηπατική απόπτωση που χαρακτηρίζει τη ΜΑΣ¹¹.

Ο ΔΜΣ υπολογίστηκε με τον τύπο: βάρος σώματος (kg) / ύψος² (m²). Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλη (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) υπολογίστηκε με τον τύπο του Friedewald¹². Υπολογίστηκαν επίσης οι λόγοι περιφέρεια μέσης / περιφέρεια ισχίου (waist to hip ratio), SGOT / SGPT και HMW αδιπονεκτίνη / ολική αδιπονεκτίνη. Για την ποσοτικοποίηση της ινσουλινοαντίστασης χρησιμοποιήθηκαν δύο δείκτες: 1) ομοιοστατικό μοντέλο εκτίμησης της ινσουλινοαντίστασης (homeostatic model assessment-insulin resistance, HOMA-IR) και 2) ποσοτικός δείκτης ινσουλινοευαισθησίας (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index, QUICKI), που υπολογίζονται με τους τύπους:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{γλυκόζη [mmol/L]} * \text{ινσουλίνη [}\mu\text{U/mL]}) / 22,5^{13}$$

$$\text{QUICKI} = 1/(\log(\text{γλυκόζης [mg/dL]} + \log(\text{ινσουλίνης [}\mu\text{U/mL]}))^{14}$$

Όλες οι προαναφερθείσες παράμετροι επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενη βιβλιογραφία⁸ ή με βάση την παθογένεια της ΜΑΛΝΗ^{4,15}.

Στατιστική Ανάλυση

Αρχικά έγινε σύγκριση των διαφόρων παραμέτρων μεταξύ των ομάδων (ασθενείς με ΜΑΗ και ΜΑΣ). Ακολούθησε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση προς ανεύρεση ανεξάρτητων παραμέτρων πρόγνωσης της ΜΑΣ. Τέλος, έγινε σύνθεση των παραμέτρων που αποτελούσαν ξεχωριστά ανεξάρτητους παράγοντες πρόβλεψης προς δημιουργία σύνθετου μη-επεμβατικού δείκτη πρόγνωσης της ΜΑΣ.

Οι συνεχείς ποσοτικές μεταβλητές περιγράφονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως καθαροί αριθμοί ή/και ποσοστά. Ο έλεγχος της κανονικότητας των μεταβλητών έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων για τις κατηγορικές μεταβλητές έγιναν με τις δοκιμασίες Chi-Square ή Fischer exact test. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων για τις ποσοτικές μεταβλητές έγιναν με τη δοκιμασία Mann-Whitney test. Σε όλες μεταβλητές παρείχαν $p < 0,1$ στη σύγκριση μεταξύ ΜΑΗ και ΜΑΣ, εφαρμόστηκε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση για ξεχωριστή προσαρμογή τους ως προς την ηλικία, το φύλο και τον ΔΜΣ. Στην πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση εφαρμόστηκε η μέθοδος enter. Οι

ανεξάρτητες μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή λογαριθμοποιήθηκαν πριν εισαχθούν σε αυτό το μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης. Τέλος, όσες μεταβλητές παρείχαν $p < 0,05$ μετά την προαναφερθείσα προσαρμογή τους για ηλικία, φύλο και ΔΜΣ, συνδυάστηκαν μεταξύ τους σε νέο σύνθετο μοντέλο πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης για πρόγνωση της ΜΑΣ. Ο υπολογισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη (receiver operating characteristic, ROC) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της απόδοσης του σύνθετου μοντέλου και για τον υπολογισμό ευαισθησίας, ειδικότητας, θετικής προγνωστικής αξίας (positive predictive value, PPV) και αρνητικής προγνωστικής αξίας (negative predictive value, NPV). Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC μπορεί να λάβει τιμές από 0 έως 1. Όσο οι τιμές τείνουν στο 1, τόσο καλύτερα το μοντέλο μπορεί να προβλέψει το γεγονός (π.χ., τη ΜΑΣ στη μελέτη αυτή). Αντίθετα, όσο οι τιμές τείνουν στο 0, τόσο το μοντέλο κρίνεται μη-κατάλληλο για την πρόβλεψη. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε τιμή $p < 0,05$ (two-tailed) για όλες τις δοκιμασίες. Η στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Αποτελέσματα

Τριάντα ασθενείς (8 άνδρες, 22 γυναίκες) με ΜΑΛΝΗ (15 με ΜΑΗ και 15 με ΜΑΣ) συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Τα συγκριτικά κλινικά και σωματομετρικά δεδομένα των δύο ομάδων παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Οι ασθενείς με ΜΑΗ είχαν, όπως αναμενόταν εξ ορισμού, σημαντικά χαμηλότερο ΝΑΣ από τους ασθενείς με ΜΑΣ ($1,6 \pm 0,1$ έναντι $3,9 \pm 0,3$, αντίστοιχα, $p < 0,001$). Τονίζεται ότι δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά το φύλο, την ηλικία, τον ΔΜΣ, την περιφέρεια μέσης και τον λόγο περιφέρειας μέσης / περιφέρεια ισχίου. Τα συγκριτικά δεδομένα μεταξύ των ομάδων όσον αφορά τις μετρηθείσες στον ορό και τις υπολογισθείσες παραμέτρους παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται και το εύρος τιμών αναφοράς του εργαστηρίου για τις μετρηθείσες παραμέτρους. Οι ασθενείς με ΜΑΣ είχαν σημαντικά υψηλότερα λευκά αιμοσφαίρια, SGOT, TKE και CK-18, αλλά χαμηλότερη ουρία, κρεατινίνη και ομοκυστεΐνη, συγκριτικά με τους ασθενείς με ΜΑΗ.

Οι επτά αυτές μεταβλητές, καθώς και ακόμη τέσσερις, που παρείχαν $p > 0,05$, αλλά $< 0,1$ στη σύγκριση ΜΑΗ-ΜΑΣ (αριθμός λεμφοκυττάρων,

Πίνακας 1. Συγκριτικά κλινικά και σωματομετρικά δεδομένα μεταξύ ασθενών με ΜΑΗ και ΜΑΣ.

	ΜΑΗ	ΜΑΣ	p-value*
Άνδρες / Γυναίκες (N)	5 / 10	3 / 12	0,682
Ηλικία (έτη)	$53,9 \pm 2,6$	$53,8 \pm 3,1$	0,739
Διάρκεια τρανσαμινασαιμίας (έτη)	$6,7 \pm 1,1$	$4,4 \pm 0,8$	0,102
Βάρος (kg)	$85,9 \pm 4,6$	$87,5 \pm 4,4$	0,618
Ύψος (m)	$1,64 \pm 0,03$	$1,60 \pm 0,02$	0,349
ΔΜΣ (kg/m ²)	$31,9 \pm 1,3$	$34,1 \pm 1,4$	0,290
Περιφέρεια μέσης (cm)	$105,1 \pm 3,3$	$107,8 \pm 2,5$	0,315
Περιφέρεια ισχίου (cm)	$106,4 \pm 2,6$	$110,3 \pm 2,9$	0,319
Waist to hip ratio	$0,99 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,01$	0,686
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	142 ± 3	151 ± 6	0,304
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	91 ± 3	92 ± 3	0,866
Σφύξεις (N/min)	73 ± 2	73 ± 2	0,783

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου (SEM) ή απόλυτοι αριθμοί

*: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων (Mann-Whitney test για ποσοτικές και Chi-square test για κατηγορικές μεταβλητές)

SGPT, οιστραδιόλη και QUICKI), προσαρμόστηκαν ξεχωριστά με πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση, για να ελεγχθεί αν μπορούσαν να προβλέψουν τη ΜΑΣ ανεξάρτητα από ηλικία, φύλο και ΔΜΣ (Πίν. 3). Για τις ανάγκες αυτής της ανάλυσης, οι TKE, CK-18 και οιστραδιόλη λογαριθμοποιήθηκαν, επειδή δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή. Μετά την προσαρμογή ως προς ηλικία, φύλο και ΔΜΣ, οι SGOT, log(TKE) και ομοκυστεΐνη δείχθηκε ότι αποτελούσαν ξεχωριστούς παράγοντες πρόγνωσης της ΜΑΣ. Οι τρεις αυτές μεταβλητές συνδυάστηκαν μεταξύ τους σε σύνθετο μοντέλο πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (Πίν. 4). Για τις ανάγκες του σύνθετου μοντέλου, οι τρεις μεταβλητές διχοτομήθηκαν με βάση το ανώτερο όριο των τιμών αναφοράς για το εργαστήριο, ως εξής: ομοκυστεΐνη ($< 12,5$ ή $\geq 12,5$ $\mu\text{mol/L}$), SGOT (< 37 ή ≥ 37 U/L) και TKE (< 20 ή ≥ 20 mm). Το μοντέλο αυτό παρείχε R-square = 0,563 ($p = 0,001$) και είχε περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC $0,873 \pm 0,066$ ($p < 0,001$) (Εικ. 1), με ευαισθησία, ειδικότητα, PPV και NPV για πρόβλεψη ΜΑΣ 73,3%, 86,7%, 84,6% και 76,5%, αντίστοιχα. Καθεμία από τις τρεις μεταβλητές του προέβλεπε την ύπαρξη ΜΑΣ ανεξάρτητα από τις άλλες δύο. Ασθενείς με χαμηλότερη ομοκυστεΐνη και υψηλότερες SGOT και TKE είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να πάσχουν από ΜΑΣ.

Πίνακας 2. Συγκριτικά δεδομένα μετρηθεισών στον ορό και υπολογισθεισών παραμέτρων μεταξύ ασθενών με ΜΑΗ και ΜΑΣ

	ΜΑΗ	ΜΑΣ	p-value*	Τιμές αναφοράς
Άνδρες / Γυναίκες (N)	5 / 10	3 / 12	0,682	–
Αιματοκρίτης (%)	41,4 ± 0,9	40,6 ± 0,8	0,442	γυναίκες: 37-47 άνδρες: 40-52
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	14,1 ± 0,4	13,7 ± 0,2	0,507	γυναίκες: 12-16 άνδρες: 14-18
Λευκά αιμοσφαίρια (N/μL)	5.638 ± 313	6.489 ± 306	0,036	3.800-10.500
Πολυμορφοπύρηνα (N/μL)	3.136 ± 238	3.576 ± 247	0,191	1.600-6.500
Λεμφοκύτταρα (N/μL)	1.913 ± 135	2.230 ± 140	0,093	1.500-3.600
Μονοκύτταρα (N/μL)	443 ± 37	469 ± 31	0,130	0-1.000
Αιμοπετάλια (103*N/μL)	228 ± 15	245 ± 17	0,191	150-450
SGOT (U/L)	27,4 ± 2,0	48,9 ± 9,8	0,006	10-37
SGPT (U/L)	41,7 ± 5,5	72,3 ± 16,5	0,097	10-45
SGOT/SGPT	0,76 ± 0,07	0,79 ± 0,06	0,443	ΜΚ
γ-GT (U/L)	46,5 ± 11,7	56,9 ± 11,2	0,430	0-38
ALP (U/L)	83,8 ± 7,5	78,3 ± 6,4	0,819	30-120
Ολική χολερυθρίνη (mg/dL)	0,82 ± 0,12	0,70 ± 0,05	0,611	0,3-1,2
Άμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,589	0-0,2
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	202 ± 10	226 ± 9	0,106	<200†
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	162 ± 22	205 ± 28	0,178	<150
HCL-C (mg/dL)	51 ± 3	48 ± 1	0,663	γυναίκες: >50 άνδρες: >40
LDL-C (mg/dL)	119 ± 10	137 ± 9	0,198	<160†
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,4	0,852	2,6-6,6
Ουρία (mg/dL)	33,7 ± 1,7	28,2 ± 1,5	0,020	17-43
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,94 ± 0,04	0,83 ± 0,03	0,040	0,6-1,1
Κάλιο (mmol/L)	4,3 ± 0,1	4,5 ± 0,1	0,258	3,5-5,1
Νάτριο (mmol/L)	142 ± 1	141 ± 1	0,436	136-145
LDH (U/L)	207 ± 10	218 ± 12	0,561	0-248
CPK (U/L)	165 ± 31	133 ± 18	0,492	0-145
TKE (mm)	14,8 ± 3,0	34,4 ± 8,9	0,024	<20
CRP (mg/L)	3,5 ± 0,4	6,2 ± 1,6	0,132	<5,0
ROMs (UCarr)	330 ± 19	352 ± 37	0,697	250-300
Ομοκυστεΐνη (μmol/L)	14,7 ± 0,5	12,5 ± 0,6	0,017	3,7-12,5
Φυλλικό οξύ (ng/mL)	12,6 ± 1,5	10,6 ± 1,3	0,213	>5,4
Βιταμίνη B12 (pg/mL)	389 ± 38	382 ± 36	0,724	211-911
Σίδηρος (μg/dL)	100,8 ± 9,8	86,1 ± 5,6	0,383	70-180
Φερριτίνη (ng/mL)	96,9 ± 12,4	124,5 ± 21,8	0,534	10-291
AFP (ng/mL)	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,8	0,648	0-15
CK-18 (U/L)	264 ± 13	559 ± 14	0,041	ΜΚ
Γλυκόζη (mg/dL)	99,9 ± 7,3	106,9 ± 5,3	0,125	60-100
Ινσουλίνη (μU/mL)	10,2 ± 1,8	19,7 ± 5,4	0,213	6-27
HOMA-IR	2,49 ± 0,45	5,32 ± 1,40	0,127	ΜΚ
QUICKI	0,349 ± 0,010	0,328 ± 0,014	0,078	ΜΚ
SHBG (nmol/L)	33,2 ± 3,6	34,1 ± 6,3	0,432	ΜΚ
Τεστοστερόνη (ng/mL)	151,2 ± 47,2	94,0 ± 44,9	0,212	γυναίκες: 49-113 άνδρες: 200-767
Οιστραδιόλη (pg/mL)	27,5 ± 1,4	24,1 ± 1,6	0,069	γυναίκες: 12-160 άνδρες: 12-56
Κορτιζόλη (μg/mL)	3,4 ± 1,3	13,1 ± 1,4	0,852	5-20
DHEAS (μg/dL)	74,8 ± 9,1	72,0 ± 15	0,120	35-430
Ολική αδιπονεκτίνη (μg/mL)	4,8 ± 0,8	5,1 ± 0,6	0,395	ΜΚ
HMW αδιπονεκτίνη (μg/mL)	2,2 ± 0,4	2,5 ± 0,4	0,468	ΜΚ
HMW/Ολική αδιπονεκτίνη	0,50 ± 0,08	0,48 ± 0,03	0,760	ΜΚ
Βισφατίνη (ng/mL)	6,2 ± 1,0	6,0 ± 0,7	0,724	ΜΚ
TNF-α (pg/mL)	18,2 ± 3,3	16,0 ± 1,8	0,569	ΜΚ

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα μέσου όρου (SEM) ή απόλυτοι αριθμοί

*: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων (Mann-Whitney test για ποσοτικές και Chi-square test για κατηγορικές μεταβλητές), με έντονη διαβάθμιση παρουσιάζονται όσες μεταβλητές παρείχαν p<0,05

†: Οι τιμές αναφοράς αναφέρονται σε ασθενείς χωρίς άλλους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου

ΜΚ: μη-καθορισμένο

Πίνακας 3. Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης για πρόβλεψη της ΜΑΣ μετά προσαρμογή των ανεξάρτητων μεταβλητών ξεχωριστά ως προς την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ*.

	Μοντέλο				Παράμετρος		
	R-square	p-value	Beta	SEM	p-value	Adjusted odds ratio	95% CI
Πολυμορφοπύρηνα (N/μL)	0,209	0,275	0,001	0,001	0,097	1,001	1,000-1,001
Λεμφοκύτταρα (N/μL)	0,171	0,392	0,001	0,001	0,151	1,001	1,000-1,003
SGOT (U/L)	0,428	0,020	0,118	0,053	0,027	1,125	1,014-1,249
SGPT (U/L)	0,287	0,122	0,032	0,019	0,087	1,033	0,995-1,072
Ουρία (mg/dL)	0,257	0,170	-0,135	0,070	0,053	0,874	0,762-1,002
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,225	0,235	-7,178	4,046	0,076	0,001	0,001-2,120
Log (TKE) (mm)	0,338	0,067	3,699	1,742	0,034	40,391	1,330-1226
Ομοκυστεΐνη (μmol/L)	0,296	0,041	-0,455	0,222	0,041	0,634	0,41-0,981
Log (CK-18) (U/L)	0,292	0,115	5,307	2,971	0,074	201,7	0,597-68237
Log (οιστραδιόλης) (pg/mL)	0,234	0,216	-9,159	5,038	0,069	0,001	0,001-2,046
QUICKI	0,098	0,680	-6,451	9,149	0,481	0,002	0-96913

*: Εντός της εξαρτημένης μεταβλητής, αποδόθηκε η τιμή 0 στους ασθενείς με ΜΑΗ και η τιμή 1 στους ασθενείς με ΜΑΣ. Έτσι beta αρνητικού πρόσημου σημαίνει ότι η αντίστοιχη παράμετρος ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με ΜΑΗ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΜΑΣ, ενώ beta θετικού πρόσημου σημαίνει το αντίστροφο.

Με έντονη διαβάθμιση παρουσιάζονται όσες μεταβλητές παρείχαν $p < 0,05$

Πίνακας 4. Σύνθετο λογιστικό μοντέλο πρόγνωσης της ΜΑΣ*.

	Beta	SEM	p-value	Adjusted odds ratio	95% CI
Ομοκυστεΐνη (μmol/L)	-3,011	1,378	0,029	0,049	0,003-0,733
TKE (mm)	2,473	1,210	0,041	11,853	1,105-127,1
SGOT (U/L)	2,697	1,279	0,035	14,839	1,209-182,1

*: Εντός της εξαρτημένης μεταβλητής, αποδόθηκε η τιμή 0 στους ασθενείς με ΜΑΗ και η τιμή 1 στους ασθενείς με ΜΑΣ. Beta αρνητικού πρόσημου σημαίνει ότι η αντίστοιχη παράμετρος ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με ΜΑΗ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΜΑΣ, ενώ beta θετικού πρόσημου σημαίνει το αντίστροφο.

Πίνακας 5. Σύνοψη προηγούμενων σύνθετων προγνωστικών μελετών για τη ΜΑΣ.

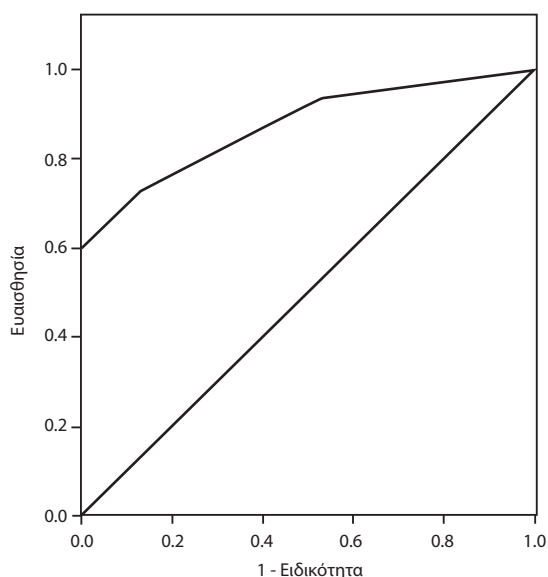
Ιος συγγραφέας, έτος*	Όνομα δοκιμασίας	Εκτιμώμενες παράμετροι	Περιοχή κάτω από τη ROC	Επιπρόσθετες πληροφορίες
Palekar, 2006 ¹⁶	MK	Ηλικία Φύλο SGOT SGPT SGOT / SGPT Υαλουρονικό οξύ	0,76	Οι ασθενείς χωρίς ίνωση είχαν αποκλεισθεί από τη μελέτη
Roynard, 2006 ¹⁷	NashTest	Ηλικία Ύψος Βάρος Φύλο Χοληστερόλη Τριγλυκερίδια SGOT SGPT γ-GT Ολική χολερυθρίνη Απολιποπρωτεΐνη-A1 α2-μακροσφαιρίνη Απποσφαιρίνη	0,79	

Πίνακας 5. (συνέχεια)

Ιος συγγραφέας, έτος*	Όνομα δοκιμασίας	Εκτιμούμενες παράμετροι	Περιοχή κάτω από τη ROC	Επιπρόσθετες πληροφορίες
Younossi, 2008 ¹⁸	NASH diagnostics	CK-18 (M30) CK-18 (M65) Αδιπνεκτίνη Ρεξιστίνη	0,73	
Sumida, 2011 ¹⁹	NAFIC	Ινσουλίνη Φεργιτίνη Κολλαγόνο 7S (τύπου 4)	0,78	
Tamimi, 2011 ²⁰	Apoptosis panel	CK-18 (M30) Διαλυτός Fas	0,79	
Shimada, 2007 ²¹	MK	Αδιπνεκτίνη HOMA-IR Κολλαγόνο 7S (τύπου 4)	MK	Μόνο ασθενείς με ήπια ίνωση (σταδίου 1 και 2 κατά Brunt) συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη
Younossi, 2011 ²²	NAFLD Diagnostic Panel	Φύλο ΔΜΣ ΣΔ2 Τριγλυκερίδια CK-18 (M30) CK-18 (M65)	0,81	

*: Οι αναφορές παρουσιάζονται χρονολογικά με βάση την ημερομηνία δημοσίευσής τους

MK: Μη-καθορισμένο / Δεν αποδόθηκε συγκεκριμένη ονομασία στον δείκτη ή δεν υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC



Εικόνα 1. Καμπύλη ROC για πρόβλεψη της ΜΑΣ από τον μη-επεμβατικό δείκτη HSENSI.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, μετά την εφαρμογή λογιστικής παλινδρόμησης στους ασθενείς με ΜΑΛΝΗ για προσαρμογή κάθε αναφερόμενης

ανεξάρτητης μεταβλητής ξεχωριστά ως προς ηλικία, φύλο και ΔΜΣ, οι μεταβλητές που προέβλεπαν ανεξάρτητα τη ΜΑΣ (ομοκυστεΐνη, SGOT και ΤΚΕ) συνδυάστηκαν μεταξύ τους για τη δημιουργία σύνθετου μοντέλου πρόγνωσης της ΜΑΣ. Στο μοντέλο αυτό ως ανεξάρτητες μεταβλητές εισήχθησαν οι ομοκυστεΐνη (<12,5 ή ≥12,5 μmol/L), SGOT (<37 ή ≥37 U/L) και ΤΚΕ (<20 ή ≥20 mm) και βρέθηκε ότι δύναται να προβλέψει τη ΜΑΣ με ευαισθησία 73,3%, ειδικότητα 86,7%, PPV 84,6% και NPV 76,5%. Είναι αξιοσημείωτο ότι και οι τρεις μεταβλητές του μοντέλου προέβλεπαν ανεξάρτητα τη ΜΑΣ, ώστε οι ασθενείς με χαμηλότερη ομοκυστεΐνη και υψηλότερες SGOT και ΤΚΕ να έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα παρουσίας ΜΑΣ. Ο δείκτης αυτός επονομάστηκε HSENSI (ακρωνύμιο των λέξεων Homocysteine, SGOT, Erythrocyte sedimentation rate, Nonalcoholic Steatohepatitis Index), και είναι ο πρώτος μη-επεμβατικός δείκτης για ΜΑΣ που αναφέρεται σε ελληνικό πληθυσμό.

Η κλινική σημασία του δείκτη HSENSI φαίνεται ιδιαίτερα σημαντική, έχοντας υπόψη ότι το μοντέλο αυτό αποτελείται από τρεις εύκολα μετρήσιμες μεταβλητές. Στη συνάφεια αυτή και με βάση τα αναφερόμενα δεδομένα της παρούσης μελέτης, ο δείκτης αυτός δυνατόν να προτείνεται

στους ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα υπερηχογραφικώς ΜΑΑΝΗ για να υποβληθούν σε μέτρηση των τριών αυτών παραμέτρων του ορού και να ακολουθήσει διαγνωστικός ιστολογικός ηπατικός έλεγχος σε περίπτωση ομοκυστεΐνης $<12,5 \mu\text{mol/L}$, $\text{SGOT} \geq 37 \text{ U/L}$ και $\text{TKE} \geq 20 \text{ mm}$.

Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC του HSENSI (0,873) βρέθηκε μεγαλύτερη συγκριτικά με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων δεικτών που έχουν προταθεί για διάκριση ΜΑΗ-ΜΑΣ¹⁶⁻²², βρέθηκε ότι είναι μεγαλύτερη, επειδή οι υπόλοιποι δείκτες αναφέρανε μικρότερες περιοχές κάτω από την καμπύλη ROC (0,73-0,81)¹⁶⁻²⁰. Στον πίνακα 5 παρουσιάζεται σύνοψη προηγούμενων σύνθετων προγνωστικών μελετών για διάκριση ΜΑΗ-ΜΑΣ. Έχοντας υπόψη ότι ο κάθε δείκτης αναφέρεται σε διαφορετικό πληθυσμό, δεν δύναται να υποστηριχθεί υπεροχή του HSENSI από μία όχι άμεσα συγκριτική (head-to-head) μελέτη, απαιτώντας σχετική μελλοντική προσέγγιση κατά τον σχεδιασμό της προαναφερθείσας μελέτης επαλήθευσης. Εντούτοις, ο δείκτης HSENSI δεν φαίνεται να υπολείπεται συγκριτικά με άλλους δείκτες, δηλαδή μπορεί να προβλέψει τη ΜΑΣ με τουλάχιστον παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα συγκριτικά με αυτούς. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να τονισθεί επίσης ότι η πλειονότητα των υπολοίπων δεικτών περιλαμβάνει περισσότερες ή/και πλέον δαπανηρές παραμέτρους, επομένως, ο HSENSI φαίνεται να υπερέχει από πλευράς κόστους σε σύγκριση με τους υπόλοιπους δείκτες. Επιπλέον, επισημαίνονται τα σχετιζόμενα με τον HSENSI τρία επιμέρους ακόλουθα σημεία:

1) Η TKE δεν έχει εισαχθεί σε κανένα σύνθετο μοντέλο πρόβλεψης της ΜΑΣ ή επιμέρους παραμέτρων της, όπως ίνωση ή στεάτωση, και δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα ως μεμονωμένος ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου. Η είσοδος αυτής της απλής και ευρέως διαθέσιμης παραμέτρου εκτίμησης φλεγμονής στο HSENSI έχει λογική βάση, έχοντας υπόψη ότι η ΜΑΑΝΗ αποτελεί κατάσταση ήπιας χρόνιας φλεγμονής, η οποία επιτείνεται με την πρόοδο της νόσου από ΜΑΗ σε ΜΑΣ⁴. Το ήπιο της φλεγμονής αντανακλάται και από τις τιμές της TKE, που δεν είναι ιδιαίτερα υψηλές και κυμαίνονται εντός ή λίγο πάνω από το ανώτερο όριο των τιμών αναφοράς. Εντούτοις, οι μικρές αυτές διακυμάνσεις της TKE απαιτούν προσεκτική αξιολόγηση.

2) Η εισαγωγή της SGOT στον HSENSI έχει επίσης λογική βάση, δεδομένου ότι η SGOT

συμπεριλαμβάνεται συχνά στα προτεινόμενα σύνθετα μοντέλα πρόγνωσης της ΜΑΣ και ίνωσης [NAFLD fibrosis score, Fibrometer, Enhanced Liver Fibrosis panel (ELF), Aspartate aminotransferase-to Platelet Ratio Index (APRI), FIB4]^{16,23-27}. Εντούτοις, αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι συμπεριλαμβάνεται συχνότερα η SGOT αντί της ειδικής SGPT που είναι πιο υψηλή στη ΜΑΑΝΗ, συχνά σε υπερδιπλάσια επίπεδα συγκριτικά με την SGOT⁴. Κατά συνέπεια, δυνατόν να προταθούν η SGPT και ο λόγος SGOT/SGPT ως διαγνωστικοί δείκτες της ΜΑΑΝΗ, ενώ η SGOT ως δείκτης σοβαρότητας της νόσου (ΜΑΣ), όταν η διάγνωση της ΜΑΑΝΗ επιβεβαιωθεί. Ειδικότερα, πριν τη διάγνωση της ΜΑΑΝΗ, η ανεύρεση υψηλής SGOT και ιδιαίτερα υψηλότερης έναντι της SGPT οδηγεί την κλινική σκέψη σε καταστάσεις διαφορετικές από τη ΜΑΑΝΗ, όπως η αλκοολική λιπώδης νόσος ήπατος. Εντούτοις, όταν τεθεί η διάγνωση της ΜΑΑΝΗ με αποκλεισμό όλων των αιτιών που δυνατόν να προκαλέσουν υπερηχογραφικώς λιπώδες ήπαρ, τότε η τιμή της SGOT φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο για την εκτίμηση της βαρύτητας της ΜΑΑΝΗ.

3) Η εισαγωγή ομοκυστεΐνης στον HSENSI στηρίζεται στο ότι έχει συσχετισθεί με την ινσουλινοαντίσταση και τις σχετιζόμενες καταστάσεις. Εντούτοις, είναι φαινομενικά παράδοξο το εύρημα των χαμηλότερων τιμών ομοκυστεΐνης ορού στους ΜΑΣ ασθενείς της παρούσης μελέτης αντί των αναμενόμενων υψηλότερων τιμών της εξαιτίας αυξημένης ινσουλινοαντίστασης των ασθενών με ΜΑΣ. Το φαινομενικά αυτό παράδοξο έχει ήδη διεξοδικά αναλυθεί σε προηγούμενη μελέτη μας⁹, φαίνεται δε πιθανό ότι χαμηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης δυνατόν να οδηγήσουν σε τροποποίηση ισορροπίας μεθυλικών ριζών και σε ελάττωση σχηματισμού γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία του ηπατοκυττάρου στο οξειδωτικό στρες²⁸. Επίσης, το παράδοξο αυτό εύρημα θα μπορούσε να αποδοθεί σε συγχορηγούμενα φάρμακα (π.χ., φιβροάτες ή στατίνες), διαφορετικά από αυτά που αποτελούσαν κριτήρια αποκλεισμού για την παρούσα μελέτη, τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν ιατρογενώς τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης²⁹.

Βασικά πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης είναι: 1) το γεγονός ότι η διαφορική διάγνωση ΜΑΗ-ΜΑΣ βασίστηκε σε ιστολογικό έλεγχο του ήπατος, 2) η πληθώρα μετρηθεισών και υπολογισθεισών παραμέτρων και 3) το γεγονός ότι το

σύνθετο μοντέλο αποτελείται από τρεις εύκολα μετρήσιμες μεταβλητές. Βασικός περιορισμός της είναι το μικρό μέγεθος δείγματος, δεδομένου ότι αποτελεί πιλοτική μελέτη. Επιπλέον περιορισμό αποτελεί το γεγονός ότι, εντός της κάθε ομάδας, οι ασθενείς δεν ήταν ισάριθμα κατανομημένοι στα δύο φύλα, αλλά οι άνδρες ήταν σαφώς λιγότεροι (33% και 20% σε ΜΑΗ και ΜΑΣ, αντίστοιχα). Επίσης, θα μπορούσε να προταθεί συγκεκριμένη εξίσωση ποσοτικοποίησης του κινδύνου για ΜΑΣ από το μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης, η οποία όμως θα είχε σημαντική διακύμανση εξαιτίας του σχετικά μικρού αριθμού ασθενών της μελέτης. Εξαιτίας της μη-ποσοτικοποίησης, η παρούσα μελέτη θεωρείται πρόιμη για να αποσαφηνίσει τι ισχύει στην περίπτωση που είναι θετικές 2 από τις 3 παραμέτρους. Παρά τους περιορισμούς της, οι σαφείς διαφορές μεταξύ των ΜΑΗ και ΜΑΣ στις συγκεκριμένες παραμέτρους και η κατάληξη σε σύνθετο μοντέλο πρόγνωσης μετά αυστηρά κριτήρια επιλογής μέσα από διαδικασία πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης σε δύο επίπεδα καθιστούν τη μελέτη επαλήθευσης σε μεγαλύτερο πληθυσμό επιτακτική. Η μελέτη αυτή επαλήθευσης έχει ξεκινήσει με στόχο τη στρατολόγηση περί των 100 νέων ασθενών με επιβεβαιωμένη με βιοψία ΜΑΛΝΗ στην επόμενη ζετία. Αισιοδοξούμε ότι η μελέτη αυτή θα οδηγήσει και στη δημιουργία σχετικής εξίσωσης για ποσοτικοποίηση του κινδύνου για ΜΑΣ με βάση τις προαναφερθείσες παραμέτρους.

Συμπεράσματα

Ο νέος σύνθετος μη-επεμβατικός δείκτης για τη ΜΑΣ, που επονομάστηκε HSENSI, προέκυψε μετά εφαρμογή λογιστικής παλινδρόμησης σε 2 επίπεδα στους ασθενείς με επιβεβαιωμένη με βιοψία ΜΑΛΝΗ και περιλαμβάνει την ομοκυστεΐνη, SGOT και TKE. Ο HSENSI δείχθηκε ότι προβλέπει τη ΜΑΣ με ευαισθησία 73,3%, ειδικότητα 86,7%, PPV 84,6% και NPV 76,5%. Οι τρεις μεταβλητές προβλέπουν τη ΜΑΣ ανεξάρτητα από φύλο, ηλικία και ΔΜΣ, αλλά και ανεξάρτητα ο ένας από τους άλλους δύο εντός του σύνθετου μοντέλου παλινδρόμησης. Ασθενείς με χαμηλότερη ομοκυστεΐνη και υψηλότερες SGOT και TKE έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να πάσχουν από ΜΑΣ.

Η κλινική σημασία του δείκτη HSENSI φαίνεται ιδιαίτερα σημαντική, επειδή το μοντέλο αυτό αποτελείται από τρεις εύκολα μετρήσιμες μεταβλητές. Με βάση τα δεδομένα της παρούσης

μελέτης, προτείνεται οι ασθενείς με υπερηχογραφικώς νεοδιαγνωσθείσα ΜΑΛΝΗ να υποβάλλονται σε μέτρηση των τριών αυτών παραμέτρων και να ακολουθεί διαγνωστικός ιστολογικός ηπατικός έλεγχος σε περίπτωση ομοκυστεΐνης < 12,5 μmol/L, SGOT ≥ 37 U/L και TKE ≥ 20 mm. Παρόλα αυτά, η εγκυρότητα του δείκτη HSENSI θα πρέπει βέβαια να επιβεβαιωθεί με μελέτη επαλήθευσης, πριν την ευρεία κλινική εφαρμογή του.

Abstract

Polyzos SA, Kountouras J, Slavakis A, Zafeiriadou E, Patsiaoura K, Katsiki E, Papatheodorou A, Terpos E. A novel noninvasive combined biomarker for nonalcoholic steatohepatitis based on homocysteine, SGOT and erythrocyte sedimentation rate. Hellenic Diabetol Chron 2013; 1: 47-58.

Aim: The differentiation between nonalcoholic hepatic steatosis and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) requires liver biopsy; non-invasive markers for NASH are currently a field of extensive research worldwide. Aim of this pilot study was the finding of independent predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and the development of a potential non-invasive marker predicting NASH, for the first time in Greek population.

Methods: Thirty patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [NAFL (n=15), NASH (n=15)] were included in this study. The two groups were matched for gender, age, body mass index (BMI) and waist circumference. Before liver biopsy, the patients were subjected to physical examination and blood drawing for the measurement of numerous parameters: hematological, biochemical, related to iron and homocysteine metabolism, markers of inflammation, apoptosis and oxidative stress, hormones and adipocytokines; insulin resistance indexes (HOMA-IR and QUICKI) were also calculated. Logistic regression analysis was performed in two levels, initially for the separate adjustment of each parameter for gender, age and BMI and, at a second level, for the development of a complex model for NASH prediction, where statistically significant parameters of the previous level were combined.

Results: From the numerous parameters, SGOT (p=0,027), log(TKE) (p=0,034) and homocysteine (p=0,041) separately predicted NASH independently from gender, age and BMI. These parameters were entered in the complex regression model as dichotomous: homocystein < 12,5 or ≥ 12,5 μmol/L, SGOT (<37 or ≥37 U/L) and erythrocyte sedimentation rate (ESR <20 or ≥20 mm). This model provided R-square=0,563 (p=0,001) and area under the curve

ROC=0,873 ± 0,066 (p<0,001), with sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predicted value (NPV) for NASH prediction 73,3%, 86,7%, 84,6% and 76,5%, respectively. Each parameter within this model could predict NASH independently from the other two. This non-invasive marker was named HSENSI (acronym of words Homocysteine, SGOT, Erythrocyte sedimentation rate, Nonalcoholic Steatohepatitis Index).

Conclusions: This study shows for the first time the clinical significance of the non-invasive marker HSENSI, which seems to be important, because it consists of three easily measurable parameters. However, it needs a larger validation study before introduction of HSENSI in clinical practice.

Βιβλιογραφία

- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-85.
- Zois CD, Baltayiannis GH, Bekiari A, et al. Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3944-9.
- Hatzitolios A, Savopoulos C, Lazaraki G, et al. Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23: 131-4.
- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 72: 299-314.
- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-23.
- Fan JG, Jia JD, Li YM, et al. Guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: update 2010 (published in Chinese on Chinese Journal of Hepatology 2010; 18:163-166). *J Dig Dis* 2011; 12: 38-44.
- Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010; 53: 372-84.
- Müller MH, Ferguson MA, Dillon JF. Systematic review of performance of non-invasive biomarkers in the evaluation of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2011; 31: 461-73.
- Polyzos SA, Kountouras J, Patsiaoura K, et al. Serum homocysteine levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2012; 11: 68-76.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van NM, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-21.
- Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009; 50: 1072-8.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2402-10.
- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. Nonalcoholic fatty liver disease: Multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46: 272-84.
- Palekar NA, Naus R, Larson SP, Ward J, Harrison SA. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 151-6.
- Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, et al. Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of nonalcoholic steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 34.
- Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, et al. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 2008; 18: 1430-7.
- Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, et al. A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2011; 46: 257-68.
- Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhoury N, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *J Hepatol* 2011; 54: 1224-9.
- Shimada M, Kawahara H, Ozaki K, et al. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1931-8.
- Younossi ZM, Page S, Rafiq N, et al. A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis. *Obes Surg* 2011; 21: 431-9.
- Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846-54.
- Cales P, Laine F, Boursier J, et al. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol* 2009; 50: 165-73.
- Guha IN, Parkes J, Roderick P, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008; 47: 455-60.
- Kruger FC, Daniels CR, Kidd M, et al. APRI: a simple bedside marker for advanced fibrosis that can avoid liver biopsy in patients with NAFLD/NASH. *S Afr Med J* 2011; 101: 477-80.

27. *Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ.* Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 1104-12.
28. *Deminice R, Portari GV, Marchini JS, Vannucchi H, Jordao AA.* Effects of a low-protein diet on plasma amino acid and homocysteine levels and oxidative status in rats. *Ann Nutr Metab* 2009; 54: 202-7.
29. *Ntaios G, Savopoulos C, Chatzopoulos S, Mikhailidis D, Hatzitolios A.* Iatrogenic hyperhomocysteinemia in patients with metabolic syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Atherosclerosis* 2011; 214: 11-9.

Λέξεις-κλειδιά:

Ινσουλινοαντίσταση
Μη-αλκοολική ηπατοστεάτωση
Μη-αλκοολική λιπώδης νόσος ήπατος
Μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα
Μη-επεμβατικός δείκτης
Ομοκυστεΐνη
Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων
SGOT

Key-words:

Insulin resistance
Nonalcoholic steatosis
Nonalcoholic fatty liver disease
Nonalcoholic steatohepatitis
Non-invasive marker
Homocysteine
Erythrocyte sedimentation rate
SGOT