

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOLOGIA APPLICATA E FISIOPATOLOGIA**

Ciclo 23°

Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore Scientifico disciplinare: MED/09

**IL “PROGETTO BAGNACAVALLO”:
PREVALENZA
DELL'IPERTRANSAMINASEMIA E
NAFLD NELLA POPOLAZIONE
GENERALE**

Presentata da: Dott.ssa Sara Savini

Coordinatore Dottorato

Prof. Lucio I. Cocco

Relatore

Prof. Mauro Bernardi

INDICE

INTRODUZIONE	p.2
ENZIMI EPATICI	p.4
<i>Transaminasi e gammaGT</i>	p.4
<i>Ipertransaminasemia e incremento delle gammaGT nella patologia epatica</i>	p.5
<i>Alterazione degli enzimi epatici: dati di prevalenza</i>	p.6
EPATOPATIE: CAUSE PRINCIPALI	p.8
<i>Infezione da HCV e HBV</i>	p.8
<i>Alcol e Alcoholic fatty liver disease</i>	p.9
NON ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE	p.11
<i>La steatosi epatica</i>	p.11
<i>La NAFLD</i>	p.14
<i>Epidemiologia</i>	p.14
<i>Clinica</i>	p.15
<i>Patogenesi</i>	p.15
<i>Storia naturale della NAFLD</i>	p.19
<i>Istologia</i>	p.20
NAFLD E SINDROME METABOLICA	p.23
<i>La Sindrome Metabolica: inquadramento "storico" e criteri diagnostici</i>	p.23
<i>Sindrome Metabolica e NAFLD</i>	p.25
<i>Sindrome Metabolica e markers epatici</i>	p.26
SCOPO DELLO STUDIO	p.27
POPOLAZIONE STUDIATA, MATERIALI E METODI	p.27
RISULTATI	p.34
CONCLUSIONI	p.43
PROSPETTIVE	p.46
BIBLIOGRAFIA	p.47

INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi due decenni in particolare si è andata evidenziando a livello epatologico una entità definita oggi Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) che si è andata ad affiancare alle cause in precedenza conosciute, fino a risultare, attraverso il succedersi di riscontri scientifici, la causa prevalente di epatopatia, in particolare nei paesi occidentali e industrializzati.

Negli stessi anni un'altra problematica clinica complessa che va sotto il nome di Sindrome Metabolica si è andata via via delineando attraverso le sue molteplici correlazioni con quelle che sono le casuse di morbidità e mortalità prevalenti nella nostra realtà, dal diabete alla patologia cardiovascolare e non ultima alla NAFLD stessa.

Scopo dello Studio in oggetto a questa tesi era proprio di rivalutare nel territorio italiano la prevalenza di epatopatia in particolare correlabile alla NAFLD e la sua associazione con la Sindrome Metabolica.

ENZIMI EPATICI

Transaminasi e gammaGT

Tra enzimi presenti negli epatociti che possono essere dosati tramite semplice prelievo venoso, le transaminasi costituiscono di certo i più comuni e nella maggioranza dei casi i più utili ad evidenziare un'alterazione recente o in atto a carico del parenchima epatico e in un certo senso anche a "quantificarne" l'entità. Vengono pertanto definiti comunemente come indici di "citonecrosi" ed utilizzati nella pratica clinica allo scopo di individuare possibili danni epatici o monitorarne l'andamento. Dai laboratori vengono routinariamente dosate l'Aspartato Transaminasi (AST) o Glutamico Ossalacetico Transaminasi (GOT) e l'Alanina Transaminasi (ALT) o Glutamico Piruvico Transaminasi (GPT), abbondantemente presenti nelle cellule parenchimali epatiche dove catalizzano il trasferimento di aminogruppi per la formazione rispettivamente di Ac.Ossalacetico e AC. Piruvico; ma entrambi gli enzimi si ritrovano anche in altri tessuti: in particolare l'AST è ampiamente presente anche a livello di cuore, reni, muscolo scheletrico e cellule circolanti, mentre l'ALT, pur essendo presente anche in altri tessuti, è di solito reperibile in concentrazione molto più bassa nelle sedi extra-epatiche e pertanto ritenuta maggiormente "epato-specifica" (1). I valori di questi enzimi presentano scarsa specificità per quel che riguarda le cause di un eventuale danno epatico: sono piuttosto un sensibile indice di infiammazione/citonecrosi recente, in quanto presentano una breve emivita e pertanto risultano molto utili per porre il sospetto diagnostico e per il monitoraggio nel paziente con problematiche note.

Anche il dosaggio delle GammaGlutamil Transferasi (GammaGT) costituisce un indice importante della situazione epatica; anche in questo caso si tratta di un marker molto sensibile di fronte al danno epatico, ma la cui alterazione non è di facile interpretazione, soprattutto se considerata in modo isolato, in quanto l'enzima è pressochè ubiquitario: reni, pancreas, vie biliari, cuore, milza, cervello e vesciche seminali possiedono l'enzima. Esso infatti è implicato nel metabolismo del glutatione contribuendo ai meccanismi di omeostasi dello stress ossidativo, oltre a intervenire nel trasferimento degli aminoacidi attraverso la membrana cellulare e nel metabolismo dei leucotrieni (2). In associazione con la Fosfatasi Alcalina è considerato un indice specifico di colestasi, ma negli ultimi anni diversi studi ne hanno dimostrato l'associazione con il rischio cardiovascolare, l'insufficienza renale cronica, l'insorgenza di patologia neoplastica, attraverso meccanismi per ora ancora da chiarire.

Ipertransaminasemia e incremento delle GammaGT nella patologia epatica.

Un' ipertransaminasemia o un incremento delle gammaGT può diventare estremamente suggestivo di patologia epatica in atto quando si accompagna a sintomi quali astenia, anoressia o prurito, ma ciò non accade routinariamente. Molto spesso il soggetto con danno epatico lieve-moderato può essere completamente asintomatico. Proprio per questo può accadere nella pratica clinica che livelli alterati di ALT e/o AST vengano ignorati o minimizzati. Negli ultimi anni però è risultato sempre più evidente come la persistenza di transaminasi elevate, in particolare ALT, anche a livelli poco al di sopra dei valori di riferimento di laboratorio, possa costituire un segnale importante per indagare in maniera più approfondita lo "stato di salute" del fegato e della persona in generale, come sottolineato di recente anche dall'American Association for the Study of Liver Diseases (3). Sono note già da tempo ad esempio le correlazioni positive esistenti tra livelli circolanti di ALT e BMI o trigliceridemia sia nel sesso maschile che femminile, così come con i livelli di colesterolo e di consumo alcolico nell'uomo e di glicemia nella donna (4-6).

Più recentemente però alcuni studi hanno dimostrato come la persistenza per almeno 6 mesi di un incremento lieve-moderato delle transaminasi in pazienti asintomatici, potesse comunemente rivelare un'epatopatia in corso (7). Da qui la necessità di comprendere meglio il significato e soprattutto la rilevanza clinica delle transaminasi ed in generale degli enzimi epatici per un'precise inquadramento dignostico.

Dal punto di vista biochimico l'AST infatti presenta un'emivita di 17 ± 5 ore , mentre l'ALT di 47 ± 10 ore e il loro rilascio in circolo dal momento del danno è molto precoce: nell'evento acuto le AST circolanti generalmente si accrescono immediatamente, raggiungendo in fase iniziale livelli più alti delle ALT (conseguentemente alla maggiore attività delle AST negli epatociti). Nell'arco delle prime 24-48 ore però le ALT tenderanno a diventare più elevate delle AST in conseguenza della loro maggiore emivita. In caso di danno cronico, sono normalmente le ALT più elevate delle AST; quando poi si ha la regressione della fibrosi parenchimale l'attività delle ALT tipicamente declina e il rapporto AST/ALT cresce gradualmente cosicché all'instaurarsi della cirrosi tipicamente sono le ALT che presentano i valori plasmatici più elevati (3).

Una eccezione importante è rappresentata dall'epatopatia alcolica dove è tipica la predominanza dei livelli di AST rispetto alle ALT. Nel danno epatico secondario a consumo alcolico infatti le AST sono caratteristicamente più elevate anche se è comune un lieve incremento delle ALT e questa differente espressione del rapporto AST/ALT può costituire un utile marker per distinguere l'epatopatia a genesi alcolica dalla cosiddetta Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (8) Sembra che tale

differenza di espressione laboratoristica sia legata alla più lunga emivita della AST mitocondriale, rilasciata in risposta all'assunzione di alcol a cui pare associarsi un deficit di piridossale-6-fosfato negli alcolisti, che agisce normalmente da cofattore nell'attività delle ALT (9). Nei pazienti con sospetta epatite alcolica può essere d'aiuto il dosaggio delle GammaGT sieriche per identificare laboratoristicamente chi ha sviluppato un'epatopatia cronica: generalmente se a distanza di 2-3 settimane dal momento dell'astensione alcolica si ha una normalizzazione dei valori di GammaGT, ciò depone a favore di un danno reversibile, viceversa se nonostante l'astinenza l'enzima plasmatico si mantiene elevato è molto probabile sia presente una epatopatia persistente(10)

Alterazione degli enzimi epatici: dati di prevalenza

Il riscontro di ipertransaminasemia costituisce, dai dati ottenuti da recenti studi di popolazione, un evento decisamente frequente e rilevante. Uno studio statunitense pubblicato nel 2003 effettuato su oltre 15.000 persone di età superiore ai 17 anni, riportava una prevalenza di ipertransaminasemia pari al 7.9% del campione (che se rapportato alla popolazione degli USA corrisponderebbe a circa 13 milioni di soggetti) (11). Mentre un recente studio cinese riporta, su un totale di 4072 soggetti di età compresa tra i 18 e i 79 anni, una prevalenza di livelli elevati di ALT pari al 17.53%(12); la differenza tra i dati delle due analisi è sicuramente attribuibile, almeno in parte, alle differenze in termini di "soglia" per quel che riguarda i valori di ALT . Nello studio più recente infatti tali cut-off sono stati abbassati secondo le indicazioni della letteratura attuale secondo cui si otterrebbe una maggiore sensibilità del dato stabilendo come "normali" limiti ≤ 35 per il sesso maschile e ≤ 25 per quello femminile (Lee JK et al) (13) o in maniera ancora più stringente ≤ 30 UI/l per gli uomini e ≤ 19 per le donne secondo Prati et al. (14). Nello studio di Zhang et al infatti la prevalenza si riduce al 9.79% utilizzando una soglia di 40UI/L per uomini e donne, come indicato dagli stessi autori.

Per quel che concerne l'Italia il riferimento numericamente più significativo è sicuramente rappresentato dai dati dello Studio Dionysos, su 6917 soggetti tra i 12 e i 65anni arruolati tra il 1991 e il 1993 nella popolazione di Campogalliano (Modena) e Cormon (Gorizia) riportano una prevalenza di enzimi epatici alterati (ALT, AST e GammaGT) pari al 17.5% (15). Più recentemente Pendino et al. hanno valutato la prevalenza di enzimi epatici alterati anche nelle regioni del Sud-Italia in uno studio sulla popolazione di Cittanova (Reggio Calabria) che ha coinvolto 1645 soggetti a partire dai 12 anni di età, con una prevalenza del 12.7%(16). In questo caso i cut off per la normalità delle transaminasi erano stati stabiliti in > 50 UI/L per le ALT e 45 UI/L per le AST. In quest'ultimo lavoro le cause principali venivano identificate in: consumo alcolico (5.8% del campione), infezioni virali (HCV, HBV) (3.6%) a cui si associava un 3.1% di cause non note per

mancato proseguimento delle indagini, di cui gli autori suppongono un grossa componente attribuibile alla NAFLD.

Nello studio americano sopracitato la causa nota prevalente restava il consumo alcolico (13.5% delle ipertransaminasemie) con a seguire le forme virali o associate (alcol + virus) (rispettivamente 7.9% e 6.1%). Restava circa il 60% delle ipertransaminasemie a eziologia non nota, anche in questo caso non valutabile per mancanza di follow up ed ulteriori approfondimenti.(11)

Infine nel recente studio cinese oltre alle forme alcoliche (5.6% delle ipertransaminasemie), decisamente meno numerose, e alle forme virali (> 17% con netta preponderanza delle infezioni da HBV), la causa più frequente era rappresentata dalle forme metaboliche: NAFLD, Sdr Metabolica e loro associazione (rispettivamente 10.79%; 16.25%; 20.31%). Rimaneva anche in questo studio una significativa percentuale di cause non note, pari al 34.59% delle ipertransaminasemie (12).

EPATOPATIE: CAUSE PRINCIPALI

Le cause note di epatopatie a tutt'oggi prevalenti nel mondo sono attribuibili alle principali infezioni virali (da HCV e HBV), al consumo alcolico e , come evidenziato in maniera sempre più stringente nel corso degli ultimi decenni, alla Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), che copre una fetta decisamente consistente della patologia epatica con potenziale evoluzione in flogosi cronica, fibrosi e cirrosi. Non vanno comunque dimenticate, anche se numericamente meno frequenti, epatopatie di altra origine virale, colestatica, autoimmune, tossica o metabolica, soprattutto di fronte ad un'alterazione degli enzimi epatici e quindi alla necessità di una diagnosi differenziale. alcoholics, serum GGT can help to distinguish those with or without liver disease. Increased GGT levels usually return to normal in 2–3 weeks if the patient abstains from alcohol, whereas persistently abnormal values in the absence of continued alcohol exposure suggest liver disease Errore: sorgente del riferimento non trovata.

ALT, AST and GGT (together with ALP) are also important in viral, cholestatic, autoimmune, toxic and metabolic liver diseases (24).

Riporto a seguire alcuni cenni di prevalenza per epatiti virali ed epatite alcolica; della NAFLD parlerò diffusamente in seguito.

Infezione da HCV e HBV

HCV ed HBV costituiscono una fetta importantissima delle epatopatie in Italia e nel mondo.

Per quanto riguarda l'infezione da HCV, la sua prevalenza presenta estreme variabilità a seconda delle aree geografiche considerate, sia tra continenti diversi sia sul territorio Italiano da regione a regione. Dati della letteratura presentano infatti una prevalenza del 2% di HCV positività per gli Stati Uniti (17) fino al 50% registrato in Egitto da uno studio di popolazione del 1996 (18). Il recente studio di Zhang et al sulla popolazione cinese riporta una prevalenza dell'1.1%.

Per la popolazione italiana costituisce di certo la forma virale prevalente e anche quella maggiormente associata ad evoluzione in cirrosi ed HCC sia in Italia (19-20), sia nel mondo (21). Come si accennava in precedenza, i dati di prevalenza sulla popolazione Italiana sono piuttosto variabili da nord a sud. Lo Studio Dionysos, effettuato su oltre 6000 soggetti in 2 comunità del centro-nord ha rilevato una percentuale di HCV positività del 3.2% (che raggiungeva il 10% considerando la popolazione oltre i 60 anni), di cui l' 88% HCV-RNA positivi, più della metà dei quali attribuibile al genotipo 1 (20). Anche nello studio pubblicato nel 2011 da Zani C et al sulla

popolazione di 41 città della provincia di Brescia (per un totale di circa 100.000 persone) riporta una percentuale di HCV positività pari al 3.2% con un incremento fino all'8.8% nella fascia di età superiore ai 65 anni. Il 64.7% di coloro per i quali era stato possibile raccogliere anche il dato di HCV-RNA risultava positivo, con un maggior riscontro di genotipo 2 e a seguire del genotipo 1b (22).

L'infezione da HCV nello studio di Pendino et al. sulla popolazione di Cittanova (RC) riporta invece una prevalenza di HCV positività del 6.5% con un aumento significativo della percentuale nei soggetti al di sopra dei 50 anni e con una leggera maggioranza di pazienti di sesso femminile; in questa casistica il 75.7% era anche HCV-RNA positivo e la maggioranza dei casi era attribuibile al genotipo 1b, secondariamente al genotipo 2 (16). Ancora più marcato risulta il dato ottenuto nella comunità di Buonalbergo (Napoli) da Maio et al su 488 soggetti dove la prevalenza di HCV positività risultava essere del 16.2% (oltre il 40% considerando la popolazione ultrasessantenne) con un 54.4% di HCV-RNA positività (23).

Una prevalenza maggiore nel Sud Italia era del resto già stata documentata da tempo (24-25)

Per quel che concerne l'epatite B, anche in questo caso la distribuzione delle prevalenze a livello mondiale è piuttosto variabile, essendo estremamente più comune ad esempio in Cina con valori del 4.72% (12) dove costituisce, al contrario dell'Italia, la forma virale prevalente. Per il nostro paese lo Studio Dyonisos riportava una prevalenza di HBsAg pari a 1.2% (20), mentre nella della provincia Bresciana presa in esame da Zani et al. la prealenza di HBsAg+ risultava dell'1.9% (22). Infine nello studio di Pendino et al sulla popolazione di Cittanova, lo 0.8% risultava HBsAg positivo e circa nel 50% era dosabile l'HBV-DNA, dato sovrapponibile a quello di Stroffolini et al. dove l'HBsAg era stato rinvenuto, nello studio di popolazione di una cittadina del sud Italia, nello 0.8% (27)

E' comunque interessante sottolineare come una grossa fetta di infezioni virali di entrambe le eziologie, anche in presenza di viremia dosabile, non determini incremento degli enzimi epatici: lo Studio Dionysos riporta persistente normalità delle ALT in un follow up di 9 anni nei 2/3 di HbsAg positivi e nel 35% dei pazienti con HCV-RNA positività (20)

Alcol e Alcoholic liver Disease (ALD)

L'assunzione di alcol, soprattutto a dosaggi superiori ai 20-30 gr/die, può determinare una serie di alterazioni che vanno sotto il nome di Alcoholic Liver Disease (ALD) e che comprendono dalla semplice steatosi all'epatite cronica (Alcoholic SteatoHpatitis o ASH) e cirrosi. L'Alcoholic Liver Disease rappresenta la patologia epatica maggiormente correlata con morbidità e mortalità alcol-indotta e la sua evoluzione cirrotica costituisce una delle cause più importanti di trapianto di fegato.

Essa è conseguente al consumo/abuso alcolico, cui si possono associare alterazioni clinico-laboratoristiche definite (32) e presenta aspetti patogenetici e istopatologici molto simili alla NAFLD, di cui si parlerà a seguire. Molto diverse invece sono le caratteristiche eziologiche ed epidemiologiche (31).

La steatosi conseguente al consumo di alcol, che rappresenta lo stadio precoce della ALD, secondo i dati della letteratura si può ritrovare ecograficamente fino al 90% degli alcolisti e dal 5 al 15% di costoro tenderà a sviluppare, in assenza di astensione dall'assunzione, steatoepatite e cirrosi nell'arco di 20 anni (29). Viceversa la steatosi ecografica, che solitamente rimane asintomatica, può andare incontro a regressione dopo un periodo di astensione di almeno 4-6 settimane (30). Del resto studi recenti hanno dimostrato che l'astinenza costituisce il cardine terapeutico nei pazienti con AFLD ma anche nelle forme più avanzate di malattia epatica alcolica, migliorando significativamente parametri clinici ed istologici così come i dati di sopravvivenza (33-35). L'evoluzione della AFLD è definita come Alcoholic SteatoHepatitis (ASH) ed è istologicamente verificabile alla biopsia tra gli alcolisti in percentuale tra il 10 e il 35%. Se si interviene con la sospensione alcolica circa il 10% dei soggetti potrà andare incontro a completa remissione istologica e clinica; viceversa il persistere dell'abuso alcolico incrementerebbe il rischio di cirrosi del 30-40% rispetto agli astinenti (29). Si calcola che un soggetto con ASH presenti una probabilità di sviluppare cirrosi dal 10 al 20% per anno e che circa il 70% delle ASH vadano prima o poi incontro a evoluzione cirrotica (36). Come sopra accennato gli aspetti istologici della ASH risultano molto simili a quelli della NASH, anche se sembra prevalente nella forma alcol-relata la fibrosi ad insorgenza perivenulare e la sua estensione pare proporzionale alla quantità di alcol assunto (37). L'evoluzione successiva è rappresentata dalla cirrosi, tipicamente micronodulare (38). È importante sottolineare che il rischio di sviluppare ASH sembra correlare anche con la tipologia di assunzione: un maggior rischio sembra associarsi all'assunzione fuori dal pasto e al cosiddetto "binge drinking" (39-41); viceversa bere vino sembrerebbe meno rischioso dell'assunzione di pari quantità di birra o superalcolici (42).

Per quanto concerne la prevalenza, è difficile stabilire un dato certo per la ALD e la ASH considerando che si tratta di condizioni nella stragrande maggioranza dei casi asintomatiche. Dai dati dello Studio Dionysos sull'abitudine alcolica risultava che la dose limite di alcol assunto quotidianamente per lo sviluppo di malattia epatica alcol-indotta e cirrosi (escludendo le comorbidity con HBV e HCV) sia di 30 gr/giorno (20), abitudine presente in circa il 30% del campione analizzato, con una prevalenza di casi di epatopatia pari al 2.3% (20) e di cirrosi pari allo 0.43% (su un totale di 1.1% da tutte le cause) (28). Molto interessanti risultavano le evidenze che il valore "soglia" fosse sovrapponibile per entrambi i sessi, l'effetto tossico dell'alcol fosse indipendente dal

Body Mass Index (BMI) e dal tipo di alcolici assunti e che oltre alla quantità di alcol ingerito, costituisse un elemento estremamente rilevante la modalità di assunzione, come confermato da altri dati della letteratura suddetti. In particolare l'ingestione di alcolici lontano dal pasto, è stata correlata con un'incidenza di epatopatia alcolica e cirrosi da 3 a 5 volte superiore in chi consuma alcolici a stomaco vuoto rispetto a chi beve in associazione all'assunzione di cibo (20)

Anche nello studio di Pendino et al. la prevalenza di consumo alcolico superiore ai 28gr/die era paragonabile, aggirandosi attorno allo 26.7%, dove il consumo alcolico, non associato a cofattori, costituiva la prima causa di alterazione delle transaminasi nel campione in esame (5.8% della popolazione) (16)

Dai dati di Loguercio et al. su un campione di 3300 soggetti, circa il 24% dei partecipanti presentava un'assunzione alcolica ≥ 30 gr/die (43); in questo studio, così come nella revisione sistematica di Corrao et al. (44) la dose di alcol ingerito quotidianamente correlata ad un aumento delle transaminasi risultava più alta rispetto ai dati dello Studio Dionysos (rispettivamente 50 e 40 gr/die)

NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

La Steatosi Epatica

La steatosi epatica costituisce la prima modificazione del parenchima epatico che accomuna, come si è già accennato, sia l'epatopatia alcolica sia la forma non-alcol relata e ne rappresenta quindi il pre-requisito diagnostico.

Il “gold-standard” per diagnosi definitiva di steatosi (e di steatoepatite) è rappresentato a tutt’oggi dalla biopsia epatica che ci consente di identificare il contenuto lipidico negli epatociti (si parla di steatosi epatica in presenza di un contenuto di grasso negli epatociti maggiore o uguale al 5%), ma anche di ottenere dati sull'eventuale infiltrato infiammatorio, sulla fibrosi e quindi sull'evoluzione dell'epatopatia.

Altre metodiche di imaging come la Tomografia computerizzata, la Risonanza Magnetica e l'ecografia possono darci informazioni sulla steatosi anche con elevata sensibilità (in particolare TC e RM) (45) ma non sono in grado di fornirci informazioni circa il grado di infiammazione e fibrosi. Pertanto, nonostante una ridotta sensibilità e specificità dell'ecografia nell'identificare la steatosi parenchimale rispetto ad esempio alla TC, i costi minori e la maggiore fruibilità costituiscono i presupposti per cui questa metodica sia un'accettabile procedura di prima linea per la valutazione del «fegato grasso» (46), a patto di essere eseguita da un operatore esperto.

L'aspetto ecografico della steatosi epatica può essere studiato con l'ausilio di numerosi criteri ma i più utilizzati nella pratica clinica sono quelli proposti da Saverymuttu et al. che prevedono una suddivisione dell'intensità della steatosi epatica in tre gradi. (47) Grado I: tessitura iperecogena rispetto al rene dx, Grado II: parziale attenuazione distale del fascio ultrasonoro (mancata visualizzazione delle pareti dei rami portal), Grado III: totale attenuazione distale del fascio ultrasonoro (mancata visualizzazione delle strutture profonde). In realtà sono stati proposti anche altri score diagnostici, tra i quali si segnala quello individuato da Hamaguchi et al. (48); ad ogni modo tutti gli score si basano sulla valutazione di tre parametri: brillantezza dell'ecostruttura del parenchima epatico, eventuale presenza di attenuazione distale del segnale nelle parti profonde dell'organo ed aumento del contrasto ecografico tra il parenchima epatico e la zona corticale del rene di destra. (47) Tali parametri hanno documentato specificità e sensibilità variabili per quanto concerne la presenza di steatosi effettivamente riscontrabile alla biopsia epatica ma comunque soddisfacenti per una valutazione di screening. (47,48)



Steatosi di *grado I*:
tessitura iperecogena
rispetto al rene destro.

Steatosi di *grado II*:
parziale attenuazione
distale del fascio
ultrasonoro (mancata
visualizzazione delle pareti
dei rami portalì).

Steatosi di *grado III*:
totale attenuazione distale
del fascio ultrasonoro
(mancata visualizzazione
delle strutture profonde).

Fig. I tre stadi della steatosi ecografica

La NAFLD

La NAFLD viene definita operativamente come un quadro di steatosi epatica (ossia di accumulo di lipidi negli epatociti superiore al 5% del peso del parenchima epatico) in assenza di epatite HBV e HCV-relata e non associata ad un consumo alcolico considerato "eccessivo" (a seconda dei risultati della letteratura si considera non a rischio un consumo inferiore ai 20-30 gr/die di alcol). Devono poi essere escluse altre, più rare ma possibili, cause di steatosi (malattie da accumulo, farmaci, cause nutrizionali e condizioni extra-epatiche) (49). Lo spettro della NAFLD assomiglia molto a quello precedentemente accennato della ADL e comprende alterazioni epatiche, che vanno dall'accumulo macrovescicolare di lipidi negli epatociti (steatosi semplice), alla steatoepatite non alcolica (NASH), alla fibrosi avanzata e perfino alla cirrosi.

La maggioranza dei soggetti presenta una evoluzione benigna, ma una certa parte può andare in contro quadri estremamente gravi con evoluzione cirrotica, sviluppo di epatocarcinoma (HCC) e insufficienza epatica (50).

Clinicamente la NAFLD non presenta sintomi clinici caratteristici, se non nelle fasi più avanzate quanto compaiono le manifestazioni dell'insufficienza epatica o i sintomi neoplastici; ciò è tanto vero che i portatori di NAFLD sono spesso soggetti "sani", asintomatici, in cui la diagnosi viene posta in seguito ad accertamenti strumentali e laboratoristici eseguiti per altri motivi.

Epidemiologia

Da un punto di vista epidemiologico si stima che la NAFLD interessi 20-30% della popolazione americana e di altri paesi occidentali, e la sua incidenza probabilmente aumenterà con il notevole aumento della prevalenza dell'obesità in queste popolazioni. Per quel che concerne l'Italia, i dati dello studio Dionysos evidenziavano diagnosi di NAFLD nel 25% della popolazione, ma è interessante notare come il 55% di questi non presentasse alterazione degli enzimi epatici (51) ad indicazione che l'ipertransaminasemia non può costituire un marker surrogato di NAFLD.

I dati di prevalenza risultano ancora più alti nei soggetti obesi dove raggiunge percentuali del 57.5-75%. Anche per quanto riguarda la popolazione pediatrica la prevalenza stimata della NAFLD è del 3-10%, con valori più elevati considerando i bambini obesi. La prevalenza della NAFLD risulta molto variabile nei vari gruppi etnici e tali differenze sono state correlate alla diversa prevalenza della SM, essendo le due entità estremamente legate. Dagli studi di popolazione la NAFLD appare la causa più frequente di alterazione degli enzimi di citonecrosi in soggetti adulti negli USA: circa il 90% dei casi di alterazioni asintomatiche delle aminotransferasi, una volta escluse altre cause di malattia epatica, sono attribuibili ad essa (52-53)

Interessante è notare come un altro fattore di rischio associato alla NAFLD è rappresentato da una storia familiare di steatoepatite o di cirrosi criptogenetica. Quest'ultima condizione in particolare condivide molte caratteristiche demografiche e cliniche con la NAFLD, e ciò suggerirebbe che la maggioranza delle diagnosi di cirrosi criptogenetica, soprattutto se anamnestiche, non sia altro che una NAFLD misconosciuta. Errore: sorgente del riferimento non trovata.

Clinica

Come già accennato la maggior parte dei soggetti affetti dalla NAFLD sono apparentemente sani, asintomatici e non presentano sintomi o segni clinici di malattia epatica al momento della diagnosi. Solo una minoranza dei soggetti lamentano uno stato di malessere oppure di affaticabilità ed un senso di peso o discomfort nel quadrante addominale superiore di destra. Nella maggior parte dei pazienti l'unico segno obiettivo è rappresentato dalla epatomegalia. Segni di malattia epatica cronica ed un ridotto numero di piastrine suggeriscono una malattia avanzata con cirrosi (52;54-56). Dal momento che la NAFLD nella maggior parte dei casi risulta asintomatica, è chiaro che il più delle volte la sua diagnosi è casuale, in seguito al riscontro di alterazioni laboratoristiche e/o radiologiche. Le alterazioni laboratoristiche di più frequente riscontro in caso di NAFLD sono rappresentate da alterazioni degli enzimi di citonecrosi (AST ed ALT). A differenza della ALD, nella NAFLD il rapporto AST/ALT è di solito <1. Questo rapporto tende però ad aumentare col progredire della fibrosi (43,45,46,49,54,) per cui di fronte ad un quadro di cirrosi risulta complicato interpretarne l'eziologia, soprattutto in mancanza di dati anamnestici (50;54-55;57).

In molti pazienti risultano alterati anche i valori della fosfatasi alcalina (FA) o, più comunemente, della gamma-glutamilttransferasi (γ GT), anche se generalmente con incrementi inferiori rispetto alla patologia epatica alcol-relata. Altre alterazioni, quali ipoalbuminemia, aumento del tempo di protrombina ed iperbilirubinemia possono essere documentate in pazienti con NAFLD in fase particolarmente avanzata rappresentata da una franca cirrosi. Possono riscontrarsi comunemente anche aumentati livelli di ferritinemia e, in misura minore, di saturazione della transferrina (50).

Patogenesi

I meccanismi patogenetici alla base della NAFLD non sono ancora completamente noti; ad esempio non è del tutto chiaro perché alcuni soggetti affetti da steatosi semplice sviluppino steatoepatite, mentre altri non vadano incontro alla stessa evoluzione, così come tra coloro che presentano una NASH soltanto alcuni sviluppino una malattia epatica avanzata. Infatti, circa la metà dei pazienti con NASH sviluppa fibrosi, ma solo il 15% sviluppa cirrosi e il 3% può progredire in insufficienza

epatica terminale che necessita di trapianto (55;58-59).

Ciò che appare certo è il fatto che i meccanismi che determinano la progressione della NAFLD sono molteplici e prevedono l'interazione tra predisposizione genetica, fattori ambientali e stili di vita.

Le prime ipotesi patogenetiche sulla NASH consideravano una cosiddetta "two hits hypothesis" in cui il **primo "colpo"** è rappresentato dall'accumulo epatico di trigliceridi (TG), che determina la steatosi, che a sua volta aumenterebbe la suscettibilità del fegato nei confronti di un **secondo "colpo"**, quale l'azione delle citochine/adipochine infiammatorie, la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo. Questo secondo colpo sarebbe responsabile dello sviluppo della steatoepatite e/o della fibrosi. Ultimamente poi è sempre maggiore il riconoscimento di un ruolo degli acidi grassi liberi (free fatty acids o FFA) nel promuovere direttamente il danno epatico.

Infine più recentemente è stato proposto un **terzo "colpo"** che spiegherebbe l'inadeguata proliferazione degli epatociti che si riscontra nell'evoluzione della NAFLD.

Ma si veda a seguire in maggiore dettaglio i suddetti meccanismi:

- ***Il "primo colpo": l'accumulo di trigliceridi***

Un prerequisito per lo sviluppo della NAFLD è rappresentato dall'accumulo di lipidi negli epatociti, soprattutto sotto forma di TG e può essere attribuito a diversi meccanismi come: aumentata sintesi lipidica, ridotta dismissione lipidica, ridotta ossidazione lipidica (60). È stato visto che in pazienti affetti da NAFLD circa il 60% dei TG contenuti nel fegato derivano dall'afflusso di FFA a partire dal tessuto adiposo, il 26% da lipogenesi de novo e il 15% dalla dieta. I TG possono essere accumulati all'interno degli epatociti oppure rilasciati in circolo contenuti nelle VLDL. L'alterata sintesi o rilascio delle VLDL sono stati proposti quali meccanismi patogenetici della NAFLD.

- ***Il "secondo colpo": la tossicità lipidica***

L'insulina ha una forte azione inibente sulla lipolisi nel tessuto adiposo. In condizioni di insulino resistenza ed obesità tale inibizione è ridotta ed è pertanto dimostrato un aumentato afflusso di FFA al fegato, i quali, dopo essere stati esterificati in TG, si accumulano negli epatociti contribuendo alla steatosi. L'iperinsulinemia associata alla insulino resistenza determina anche una aumentata lipogenesi de novo a livello epatico ed inibisce la β -ossidazione degli FFA come substrato energetico. Tutto ciò promuove l'accumulo di lipidi a livello epatico. Diverse anomalie descritte nella NAFLD interferiscono con la cascata di segnalazione dell'insulina e quindi contribuiscono a loro volta alla insulino resistenza. Inoltre la presenza di steatosi è strettamente associata ad uno stato infiammatorio cronico nel fegato, che risulta stimolato direttamente dagli FFA. Esistono oggi evidenze sostanziali che gli FFA possiedano una tossicità

intrinseca, attraverso la quale inducono condizioni di stress ossidativo e l'attivazione di processi infiammatori, entrambi alla base della steatoepatite. Al fine di ridurre gli effetti tossici degli FFA e limitarne la capacità di alterazione delle membrane cellulari, il parenchima epatico tende a produrre TG mediante l'esterificazione di tre FFA con una molecola di glicerolo. Pertanto l'accumulo dei TG potrebbe essere quindi anche considerato come la conseguenza di un meccanismo protettivo (60-61). Questo fenomeno risulta importante in quanto mette in relazione l'obesità centrale, e il conseguente aumentato rilascio in circolo di FFA, e lo stato infiammatorio a livello epatico (55;60). A supporto di tale ipotesi si è visto ad esempio che in modelli animali bloccando la sintesi di TG si provoca l'esacerbazione del danno epatico e della fibrosi.

Le citochinesembrano svolgere un ruolo importante nella patogenesi della NASH. Ad esempio i livelli plasmatici ed epatici di TNF risultano aumentati in pazienti con NASH e correlano con la severità del quadro istologico; il tumor necrosis factor avrebbe un ruolo non solo per la sua azione pro-infiammatoria, ma anche in quanto promotore dell'insulino-resistenza. Anche i livelli di IL-6 risultano aumentati in pazienti affetti da NAFLD e da insulino resistenza e correlano con un'aumentata infiammazione epatica e fibrosi.. Vari studi suggeriscono inoltre che lo stato infiammatorio potrebbe promuovere la cancerogenesi così come la flogosi cronica associata alla steatosi potrebbe avere un ruolo fondamentale nello sviluppo di HCC(59-60).

Sono noti in letteratura gli effetti pro- ed anti-infiammatori rispettivamente della leptina e della adiponectina e le alterazioni della concentrazione plasmatica di questi due ormoni in soggetti obesi. Si è visto che i livelli della leptina aumentano anche in pazienti affetti dalla NAFLD, pertanto è plausibile che la leptina abbia un ruolo nella patogenesi della NAFLD. Allo stesso tempo i livelli di adiponectina risultano ridotti in questi pazienti e gli studi sul ruolo della adiponectina nella patogenesi della NAFLD ipotizzano che i suoi livelli plasmatici potrebbero aiutare a distinguere la semplice steatosi dalla NASH.

Altri mediatori prodotti dal tessuto adiposo mostrano livelli aumentati in pazienti affetti da NAFLD: gli stessi TNF e IL-6, ma anche angiotensinogeno e resistina: tutte queste molecole antagonizzano gli effetti lipogenici dell'insulina, ma il loro ruolo nell'eziopatogenesi della NAFLD deve essere ancora chiarito.

Un altro fenomeno importante nella patogenesi della NAFLD è rappresentato dallo *stress ossidativo*, ossia dall'aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno, dove un grado più avanzato di malattia correla con un livello più elevato di stress ossidativo. Nei soggetti sani è attiva una via metabolica denominata β -ossidazione che utilizza come substrato gli FFA per la sintesi mitocondriale di ATP. Nei soggetti con NAFLD questo processo può risultare sovraccaricato a causa dell'eccessivo accumulo di FFA intracellulare, con conseguente

produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'accumulo di ROS induce stress ossidativo che a sua volta innesca la cascata infiammatoria e il conseguente danno cellulare e mitocondriale. In particolare si possono osservare varie alterazioni a livello dell'epatocita, quali la perossidazione lipidica, il danno al DNA e alle proteine fino alla morte cellulare. La perossidazione lipidica a sua volta determina la produzione di citochine pro-infiammatorie e richiama cellule infiammatorie nel fegato. I danni ai mitocondri, sia quelli funzionali sia strutturali, sono stati documentati in soggetti affetti da NASH.

Nei meccanismi che determinano la patogenesi della NASH sembra implicato il Reticolo Endoplasmatico (RE), che può essere interessato da svariati stress biologici tra i quali l'iperinsulinemia e l'iperlipidemia. Le conseguenti alterazioni possono a loro volta contribuire all'insulino resistenza, all'infiammazione, all'apoptosi e alla disfunzione mitocondriale (60)

- ***Il "terzo colpo": l'alterazione della replicazione epatocitaria***

In un fegato sano la morte cellulare stimola la proliferazione cellulare di epatociti maturi, la quale ripristina la normale funzione tissutale. In condizioni di stress ossidativo invece, come è caratteristica della NAFLD, viene almeno in parte inibita la normale proliferazione. La conseguenza è che lo stimolo proliferativo si traduca in un'espansione della popolazione di cellule epatiche progenitrici (le cellule ovali), le quali hanno la capacità di differenziarsi in forme cellulari intermedie definite "hepatocyte-like". Il numero di cellule ovali e di elementi "hepatocyte-like" pare correlata strettamente con lo stadio della fibrosi parenchimale e con la cancerogenesi epatocellulare (60).

- ***La fibrosi***

La via finale comune di quasi tutte le epatopatie croniche, tra cui anche la NASH, è rappresentata dalla fibrosi. Essa, nella sua forma avanzata, si manifesta con cirrosi, insufficienza epatica, ipertensione portale e le sue complicanze, quali varici esofagee, ed HCC. In condizioni di danno epatico cronico i processi riparativi avvengono attraverso la proliferazione delle cellule epatiche progenitrici, anziché degli epatociti maturi. La proliferazione di queste cellule, localizzate a livello dei canali di Hering, dà origine a complessi periportali formati da elementi duttulari proliferanti ed elementi stromali (miofibroblasti e matrice fibrosa). Questo fenomeno viene chiamato reazione duttulare. L'estensione della reazione duttulare correla fortemente col grado di fibrosi, suggerendo che questo meccanismo stimoli una fibrosi periportale progressiva. Questa ipotesi spiegherebbe la fibrosi portale osservata nella NAFLD, caratteristica fondamentale di una malattia avanzata, anche se in altri studi si è osservato come la fibrosi inizi ben prima dell'espansione della popolazione di cellule progenitrici, elemento suggestivo del fatto che

probabilmente i due meccanismi si stimolano a vicenda.

Come si evince, l'insorgenza e l'evoluzione della NAFLD necessitano dell'intervento di diversi fattori, tra i quali va considerato determinante l'interazione tra suscettibilità genetica e fattori ambientali. Per riassumere possiamo dire che la NAFLD inizia con l'accumulo di lipidi nel fegato, ossia con la steatosi semplice, in genere sostenuta da condizioni patologiche quali l'obesità e l'insulino resistenza. Siccome però non tutti i pazienti con NAFLD sviluppano NASH e fibrosi, polimorfismi genici correlati al metabolismo lipidico, all'insulino resistenza, allo stress ossidativo, alle citochine e alla fibrogenesi potrebbero tutti essere chiamati in causa nella differente evoluzione (60)

Storia naturale della NAFLD

La prognosi della NAFLD dipende fondamentalmente dal quadro di evoluzione istologica e la rilevanza deriva dalla sua potenziale evoluzione verso la cirrosi, l'insufficienza epatica e l'HCC (vedi **Fig.1**). La steatosi semplice può rimanere tale per molti anni con decorso benigno e non associato ad aumentato rischio di morte. Ciononostante, è importante sottolineare che la NAFLD può frequentemente evolvere in un quadro di NASH, la quale a sua volta può progredire più o meno rapidamente in fibrosi e cirrosi con un incremento importante della mortalità. (55-56; 62-63) Infatti la percentuale di progressione della steatosi epatica verso la cirrosi è bassa, circa 1,5% e il rischio di morte per cause correlate alla malattia di fegato sono pari all'1% nell'arco di vent'anni, ma va ricordato che la prevalenza della steatosi nella popolazione è molto alta il che rende questo rischio decisamente rilevante. Come già accennato invece, la NASH porta allo sviluppo di fibrosi nel 30-50% dei casi, e di cirrosi nel 15%; circa il 3% dei pazienti affetti da NASH andranno incontro a insufficienza epatica terminale (55; 64). La prognosi a 10 anni della NAFLD associata alla cirrosi risulta molto severa, con la necessità di trapianto nel 50% dei casi, morte associata a cause epatiche nel 20% e sviluppo di HCC nel 7%.

È stata dimostrata una correlazione tra la progressione della NAFLD e vari fattori di rischio, quali età avanzata, BMI, insulino resistenza, DM, SM e quadro istologico di NASH alla diagnosi (62; 65). La presenza quindi di multipli disturbi metabolici è associata ad una malattia epatica potenzialmente progressiva e severa.

Nonostante strettamente correlata all'obesità e all'insulino resistenza, la NAFLD può svilupparsi anche in soggetti normopeso e con livelli normali di glicemia e lipidemia. Ciò ribadisce, come già sottolineato, che alla base dello sviluppo e della progressione della NAFLD vi siano molteplici

fattori genetici ed ambientali (55;62;66) Questo dato correla bene con la variabile prevalenza della NAFLD in diversi gruppi etnici. Tra i fattori di rischio di maggiore rilievo vanno sicuramente considerati l'alimentazione e l'attività fisica. In particolare, un eccessivo introito di cibo e la sedentarietà contribuiscono all'aumento di peso, il quale è dimostrato essere un fattore che contribuisce alla progressione della NAFLD verso la fibrosi. Ancora l'alto consumo di grassi saturi e colesterolo da una parte, così come il basso consumo di acidi grassi polinsaturi dall'altra, si associano allo sviluppo di NAFLD.

Istologia

Vista la notevole variabilità nella prognosi delle varie forme di NAFLD, risulta molto importante l'identificazione del quadro istopatologico e soprattutto della presenza e del grado della fibrosi. La valutazione della fibrosi epatica fornisce importanti informazioni non solo di carattere diagnostico, ma anche per quanto riguarda le decisioni terapeutiche. Sempre per sottolineare l'importanza della diagnosi del quadro istopatologico, dobbiamo ricordare che molto spesso le alterazioni a carico del fegato sono reversibili, soprattutto nelle prime fasi. Infatti, la fibrosi per molti anni era considerata un'alterazione irreversibile, ma oggi sappiamo che si tratta di un processo dinamico che ha un potenziale di risoluzione (67-72). Con la progressione della fibrosi ed eventualmente della cirrosi però, la reversibilità del quadro diventa sempre meno probabile. La diagnosi di cirrosi inoltre ci consente di mettere in atto trattamenti che hanno lo scopo di prevenire le sue complicanze.

Da un punto di vista istologico, le **alterazioni grasse** predominanti a carico del parenchima epatico sono di tipo *macrovescicolare*, e la loro severità è definita valutando la percentuale di epatociti contenenti goccioline di grasso. In particolare si parla di steatosi lieve laddove questi epatociti rappresentano <1/3 della massa totale, steatosi moderata quando >1/3 ma <2/3, severa quando >2/3. Le alterazioni grasse tendono ad interessare prevalentemente le regioni perivenulari (zona acinare 3), ma in casi severi essa si può estendere, manifestandosi con un quadro panacinare (73)

La steatoepatite è caratterizzata invece da danno cellulare, infiammazione e fibrosi, anche in questo caso prevalentemente a carico della zona acinare 3. La fibrosi si distribuisce tipicamente a livello perisinusoidale e/o pericellulare. Essa può progredire verso la cirrosi, inizialmente a pattern micronodulare. L'HCC può complicare un quadro di cirrosi sviluppata dalla NASH, ma sono stati anche documentati casi, seppur rari, di HCC sviluppati su NAFLD in fase precirrotica (73-74)

A livello portale/periportale, le lesioni istologiche della NAFLD comprendono alterazioni infiammatorie ed alterazioni biliari. Questi due patterns contribuiscono a loro volta allo sviluppo di fibrosi periportale. Nelle fasi più avanzate della NASH, l'infiammazione portale e la fibrosi possono diventare sempre più marcate.

Le alterazioni biliari sono in genere minime, ma possono diventare più importanti con l'evoluzione del quadro. Si ritiene che esse siano la conseguenza della alterata proliferazione epatocellulare indotta dalla steatosi.

Per quanto riguarda lo sviluppo di HCC, al di là dei fattori cancerogeni associati alla cirrosi in generale, vi possono essere dei fattori di rischio specifici legati alla malattia del fegato grasso. Tra questi possiamo ricordare l'insulino resistenza; la formazione di specie reattive dell'ossigeno e la perossidazione lipidica che vengono prodotti, come abbiamo visto, nella progressione della steatosi a steatoepatite e che causano danni al DNA ed eventualmente mutazioni di geni; la stessa steatosi epatica. Quest'ultima in particolare è associata a senescenza replicativa ed apoptosi degli epatociti, con conseguente stimolo alla proliferazione delle cellule progenitrici, identificata come un step importante nella cancerogenesi epatocellulare.

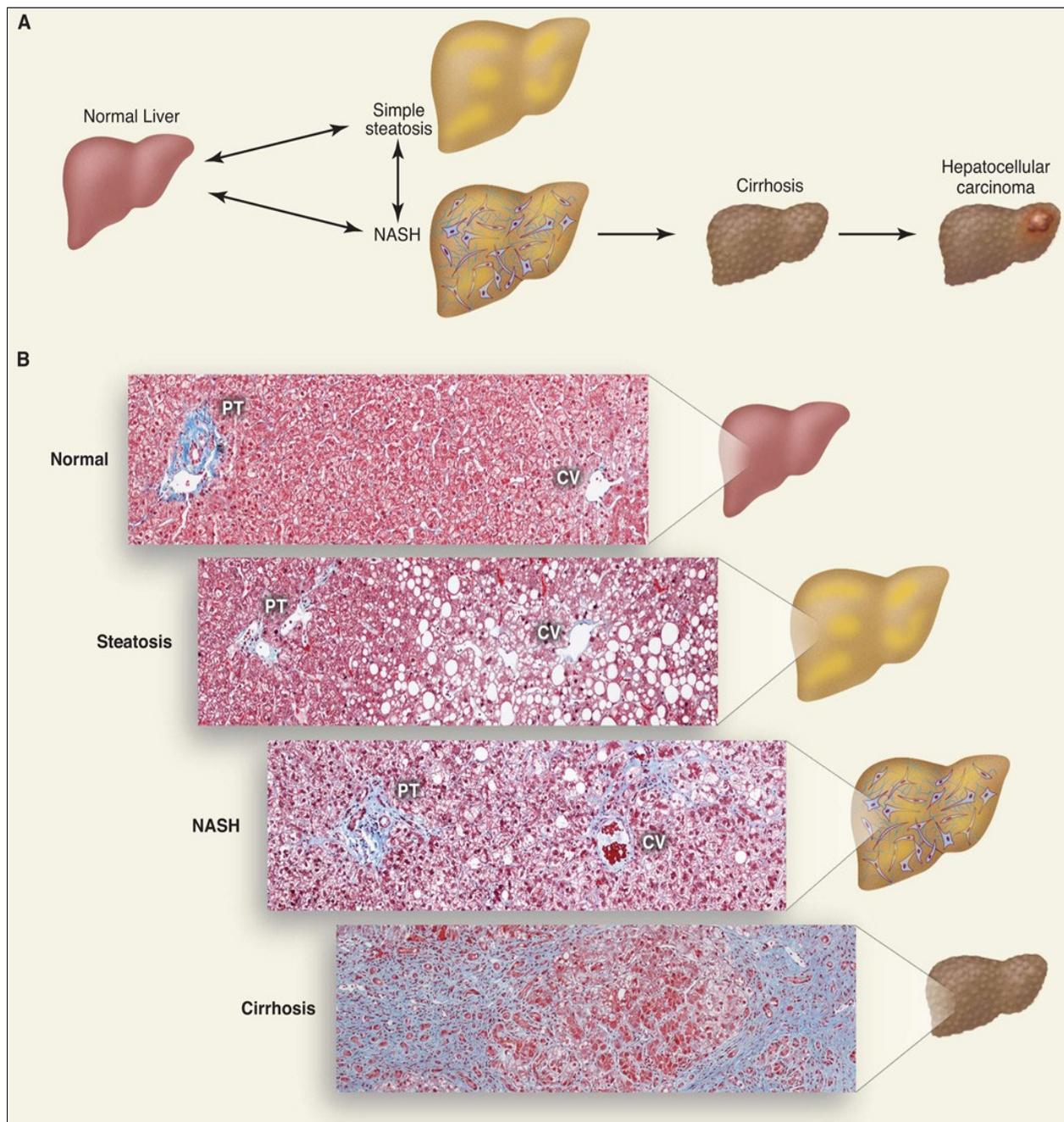


Fig. 1 Lo spettro della Non-Alcoholic Fatty Liver disease. **(A)** Progressione schematica della NAFLD. L'accumulo di TG sottoforma di gocce lipidiche negli epatociti causa la steatosi. La steatosi, quando si associa con infiammazione, morte cellulare e fibrosi viene definita NASH, che può progredire in cirrosi. I soggetti con cirrosi presentano un aumentato rischio di carcinoma epatocellulare. **(B)** Le sezioni istologiche illustrano: fegato normale, steatosi, MASH e cirrosi. Le fibre di collagene sono colorate con colorazione tricromica di Masson. Vengono evidenziate: la triade portale (PT), che comprende arteria epatica, vena porta e dotto biliare, e la vena centro (CV)

Cohen JC, et al .Human fatty liver disease: old questions and new insights. Science. 2011;24

NAFLD E SINDROME METABOLICA

La Sindrome Metabolica: inquadramento "storico" e criteri diagnostici

Già più di 80 anni fa nasceva il concetto della Sdr. Metabolica, descritta per la prima volta da Kylin (75), un medico svedese, che la definì identificando l'associazione tra ipertensione, iperglicemia e gotta.

Nel 1947 Vague (76) sottolineava per primo come vi fosse associazione tra l'obesità a fenotipo cosiddetto "centrale" o "maschile" e le alterazioni metaboliche del diabete mellito di tipo II o delle malattie cardiovascolari.

La rilevanza clinica vera e propria della sindrome fu sottolineata solo dopo 40 anni da Reaven (77), che descrisse l'esistenza di una associazione di anomalie metaboliche (tra cui l'insulino-resistenza) che fu denominata "Sindrome X". Nel corso degli anni poi molti nomi sono stati introdotti per definire o sottolineare i vari aspetti della sindrome: il "Quartetto letale", la "Sindrome da Resistenza Insulinica", ecc., anche se oggi ormai tutta la comunità scientifica si è allineata alla dicitura di Sindrome Metabolica (SM). In sostanza comunque, al di là della nomenclatura, la Sindrome individua una costellazione di alterazioni metaboliche che includono:

- intolleranza glucidica (dal diabete di tipo II alla ridotta tolleranza al glucosio all'alterata glicemia a digiuno)
- insulino-resistenza
- obesità centrale
- dislipidemia
- ipertensione

ossia una serie di ben noti fattori di rischio cardiovascolare (CV), che, si è visto, si associano tra loro nei singoli individui molto più frequentemente di quello che potrebbe essere se ciò fosse casuale, e al contempo, quando associati, determinano un incremento esponenziale del rischio CV stesso. Gli studi degli ultimi anni hanno permesso di definire più chiaramente la patofisiologia della sindrome, che è verosimilmente il risultato di una complessa interazione tra le varie vie metaboliche (78). Meno chiare risultano ancora le cause a monte dell'insorgenza della SM.

Se a tutt'oggi è generale l'accordo sul termine, non così è per la definizione della sindrome, per la quale negli ultimi anni si sono susseguite diverse classificazioni ad opera di vari organismi e associazioni scientifiche (79). Il primo tentativo di definizione ad uso internazionale risale al 1998 da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che portò alla pubblicazione nel 1999 di

una serie di criteri diagnostici (80). Il punto centrale della classificazione OMS era l'insulino-resistenza, ma l'indaginosità di certi criteri (in particolare per definire l'insulino-resistenza stessa) rendevano la definizione in pratica impossibile da usare sia nella pratica clinica sia negli studi epidemiologici. La complessità dei criteri portò l'European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) a sviluppare una definizione modificata e semplificata dal punto di vista metodologico rispetto a quella dell'OMS, pubblicata anch'essa nel 1999 (81). Anche in questo caso era ritenuta centrale l'insulino-resistenza (considerata la causa della SM) e veniva introdotta nei criteri la misurazione della circonferenza addominale. Due anni dopo veniva pubblicata la definizione del National Cholesterol Education Program of the USA: l'Adult Treatment Panel III (ATP III) (82), nata con una visione meno "glucosio-centrica" e definita specificatamente per avere una utilità clinica. E' stata accolta favorevolmente dalla comunità scientifica per la sua semplicità e applicabilità sia al contesto clinico che della ricerca. Va ancora segnalata la revisione dell'ATP III ad opera dell'American Association of Clinical Endocrinology (AACE) (83) che riportava la resistenza all'insulina ad un ruolo centrale (valutata come incremento della glicemia a digiuno e dopo carico) a cui associava ipertrigliceridemia, riduzione del colesterolo HDL ed ipertensione. Veniva invece esclusa dai criteri l'obesità, con conseguenti forti critiche dalla comunità scientifica internazionale, soprattutto alla luce delle contemporanee e crescenti evidenze del ruolo dell'obesità addominale come fattore di rischio maggiore per il diabete tipo II e le malattie CV (84;85)

Nel 2005 è stata pubblicata dall'International Diabetes Federation (IDF) una nuova classificazione (86) con l'intento di unificare le definizioni, superando il problema dell'uso di criteri diversi soprattutto nell'ambito degli studi di prevalenza e di popolazione. In questa più recente definizione, nata per fornire anche un reale strumento clinico di identificazione dei soggetti a maggiore rischio per diabete tipo II o malattia CV, si è tenuto conto dell'obesità centrale come fattore determinante e necessario nella SM. I valori di riferimento (in particolare la circonferenza addominale) sono stati definiti con una distinzione di tipo etnico derivante dagli studi a disposizione in letteratura. E' stata inoltre omessa l'insulino-resistenza perchè di difficile misurazione nella pratica clinica e per le elevate correlazioni di questo dato con la circonferenza addominale e i livelli di trigliceridi (decisamente più accessibili nella loro valutazione). Recentemente, seguendo le direttive sia dell'IDF che dell'American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI), tale classificazione è stata nuovamente modificata in modo tale per cui l'obesità addominale non è più considerata un prerequisito della Sindrome ma uno dei tre fattori necessari sui cinque possibili. (87)

I più recenti criteri diagnostici per la Sindrome Metabolica sono riportati sinteticamente in **Tabella**

Tabella 1) Criteri diagnostici della Sindrome Metabolica

	ATP III	IDF	AHA/NHLBI
Circonferenza addominale	Maschio ≥ 102 cm Femmina ≥ 88 cm	Maschio ≥ 94 cm Femmina ≥ 80 cm	Maschio ≥ 94 cm Femmina ≥ 80 cm
Pressione arteriosa	$\geq 130 / \geq 85$ mmHg o tp anti-ipertensiva	$\geq 130 / \geq 85$ mmHg o tp anti-ipertensiva	$\geq 130 / \geq 85$ mmHg o tp anti-ipertensiva
Trigliceridemia	≥ 150 mg/dl	≥ 150 mg/dl	≥ 150 mg/dl
Colesterolemia HDL	Maschio < 40 mg/dl Femmina < 50 mg/dl	Maschio < 40 mg/dl Femmina < 50 mg/dl	Maschio < 40 mg/dl Femmina < 50 mg/dl
Glicemia	≥ 110 mg/dl o tp anti-diabetica	≥ 100 mg/dl o tp anti-diabetica	≥ 100 mg/dl o tp anti-diabetica
N. criteri per positività	3 criteri su 5	Criterion 1 + 2 degli altri 4	3 criteri su 5

Sindrome Metabolica e NAFLD

La Sindrome Metabolica, come anche le sue varie componenti, è altamente correlata alla NAFLD: una o più caratteristiche tipiche della Sindrome Metabolica è presente nel 90% circa dei pazienti con NAFLD ed il 33% di questi soddisfa i parametri per la diagnosi completa (88); tanto è vero che la NAFLD viene considerata la manifestazione epatica della SM (52). In aggiunta, la presenza della Sindrome Metabolica è il più alto fattore predittivo dello sviluppo della NAFLD, sia nel sesso maschile che in quello femminile (77). I dati osservazionali dimostrano infatti chiaramente che la NAFLD presenta la sua maggiore prevalenza nei pazienti con insulino-resistenza e SM, e che obesità, DM2 ed iperlipidemia correlano strettamente con l'epatopatia non-alcol relata (60) La steatosi può essere dimostrata in più di 2/3 degli obesi e in più del 90% dei soggetti affetti da obesità patologica. La NASH colpisce il 19% dei soggetti obesi e quasi la metà dei soggetti affetti da obesità patologica. La NAFLD colpisce circa il 50% dei pazienti diabetici, e sembra che l'associazione tra obesità e DM rappresenti un fattore di rischio aggiuntivo: tra pazienti con obesità severa e diabete, il 100% presentava almeno un grado moderato di steatosi, il 50% aveva una franca steatoepatite e il 19% era già evoluto in cirrosi.

Dal punto di vista patogenetico numerose evidenze indicano che un evento di fondamentale importanza alla base della patogenesi della NAFLD è rappresentato dall'iperinsulinemia e

dall'insulino-resistenza. (58; 89-90). In particolare una ipotesi vorrebbe che l'insulino-resistenza, innescata dall'obesità e dal sovrappeso, possa essere il fattore comune alla base dello sviluppo sia della Sindrome Metabolica che della steatosi epatica, giustificandone la frequente coesistenza nello stesso soggetto. Rimane tuttavia non unanime l'interpretazione se l'insulino-resistenza sia una causa o una conseguenza della steatosi epatica. (91-95)

Sindrome Metabolica e markers epatici

Da molti anni a questa parte i livelli ematici delle transaminasi e, in maniera meno estensiva, della gamma-glutamilttransferasi vengono utilizzati come markers della NAFLD, mentre recenti evidenze mostrano un'associazione tra i livelli sierici di questi enzimi ed i molteplici fattori che compongono la Sindrome Metabolica. (47;57;96-101)

L'aumento dell'ALT ad esempio è associato positivamente con tutti i componenti della Sindrome Metabolica: ipertrigliceridemia, iperglicemia, circonferenza addominale, ipertensione arteriosa diastolica e riduzione dei livelli del colesterolo HDL. (96) In aggiunta a ciò, l'insulino-resistenza, la prevalenza di steatosi epatica severa ed i valori dell'ALT risultano significativamente più alti nei soggetti con la Sindrome Metabolica in confronto a quelli che presentano meno dei tre tra i cinque parametri clinici richiesti per la sua diagnosi. (97) I recenti dati pubblicati dal Third National Health And Nutrition Examination Survey (NHANES III) vedono un'associazione significativa tra l'aumento dell'ALT e l'insulino-resistenza, il diabete di tipo II e la Sindrome Metabolica. (98) La gamma GT, un marker meno specifico di funzionalità epatica, è legata ad obesità, ipertensione, stile di vita sedentario, iperinsulinemia, dislipidemia, infiammazione e stress ossidativo. (47;57;99-101) Inoltre, si è riscontrata un'associazione tra la concentrazione di gamma GT e l'ipertensione negli individui con obesità centrale e ciò suggerisce la possibilità di un legame tra steatosi epatica, disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare. (48)

SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio più importante sulla prevalenza della malattia epatica cronica nella popolazione italiana è sicuramente rappresentato dallo Studio Dionysos che ha valutato le cause e la distribuzione delle epatopatie tra il 1990-93 in due comunità del Nord Italia.

Negli ultimi due decenni si è fatta sempre più chiara l'importanza della Non-alcoholic Fatty Liver Disease come causa di epatopatia cronica e cirrosi, non solo nella popolazione italiana, ma anche a livello mondiale e si sono accumulate evidenze che legano in modo stretto la NAFLD e la Sindrome Metabolica, così come i suoi componenti

Per tale motivo a distanza di 15 anni si è ritenuto interessante valutare come si sia modificata la prevalenza delle varie epatopatie nella popolazione italiana, quale sia il ruolo della NAFLD e quali le sue correlazioni con la SM.

POPOLAZIONE STUDIATA, MATERIALI E METODI

Caratteristiche demografiche della popolazione studiata

Il progetto è stato svolto nell'ambito della popolazione di Bagnacavallo (RA).

Il comune di Bagnacavallo, situato in provincia di Ravenna, presenta un numero di abitanti rimasto relativamente costante negli anni, non avendo subito gli effetti di sostanziali flussi immigratori o emigratori. Come si può evincere dalla **Fig. 2**, la popolazione residente nella cittadina è rimasta stabile negli ultimi 20 anni.

Il centro di questo piccolo comune, inoltre, è dotato di un vecchio ospedale che è stato riconvertito a polo sanitario e che è raggiungibile senza particolari problemi dalla cittadinanza, con il vantaggio di poter fungere facilmente da fulcro per la conduzione di tutto lo studio.

Infine, dal confronto delle **Figg. 3 e 4** con le **Figg. 5 e 6**, è evidente che l'andamento demografico di Bagnacavallo nel periodo compreso tra il 1988 (data dell'istituzione del Centro Statistico Regionale) ed il 2009 rispecchia quello proprio dell'intera Regione Emilia Romagna.

Proprio per queste evidenze, e grazie alla collaborazione con le autorità locali, la AUSL e il Gruppo Epatologico Ravennate, è stata selezionata la popolazione che nel 2006 (data di inizio dello studio) aveva un'età compresa tra 30 e 60 anni. Questa fascia d'età è stata così definita in quanto dalla letteratura risulta essere la popolazione più colpita dalla SM dell'adulto. Sono stati perciò invitati mediante lettera tutti i cittadini interessati dallo screening, a cui si è associata una campagna informativa mediata dai Medici di Medicina Generale e dai mezzi di informazione locali. Hanno

aderito al progetto oltre 4000 cittadini dei 6920 invitati, con dati disponibili per le valutazioni statistiche relativi a 4026 soggetti (58%).

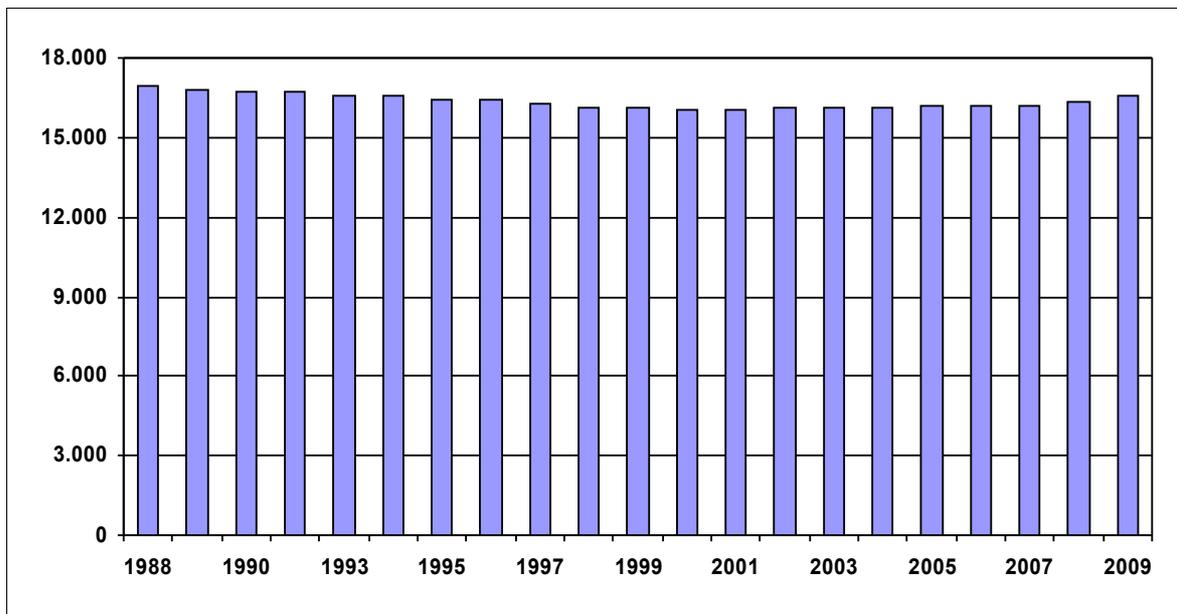


Fig. 2 Popolazione residente nel comune di Bagnacavallo tra 1988 e il 2009 (Dati del Centro Statistico Regionale)

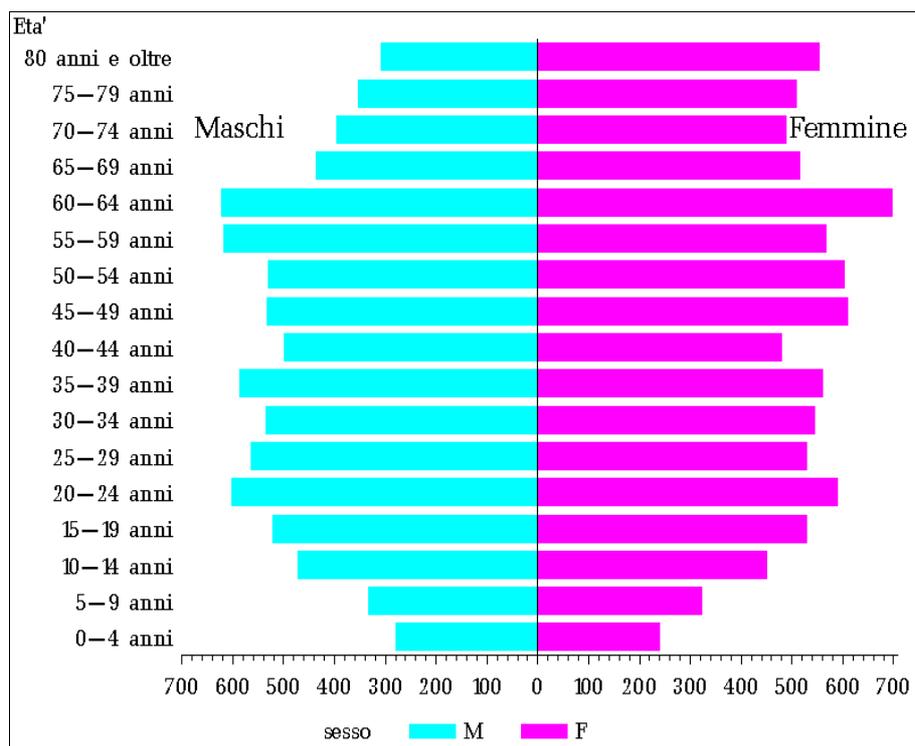


Figura 3. Piramide dell'età della popolazione residente a Bagnacavallo nel corso dell'anno 1988 (fonte Ufficio Statistico Regionale, Regione Emilia Romagna)

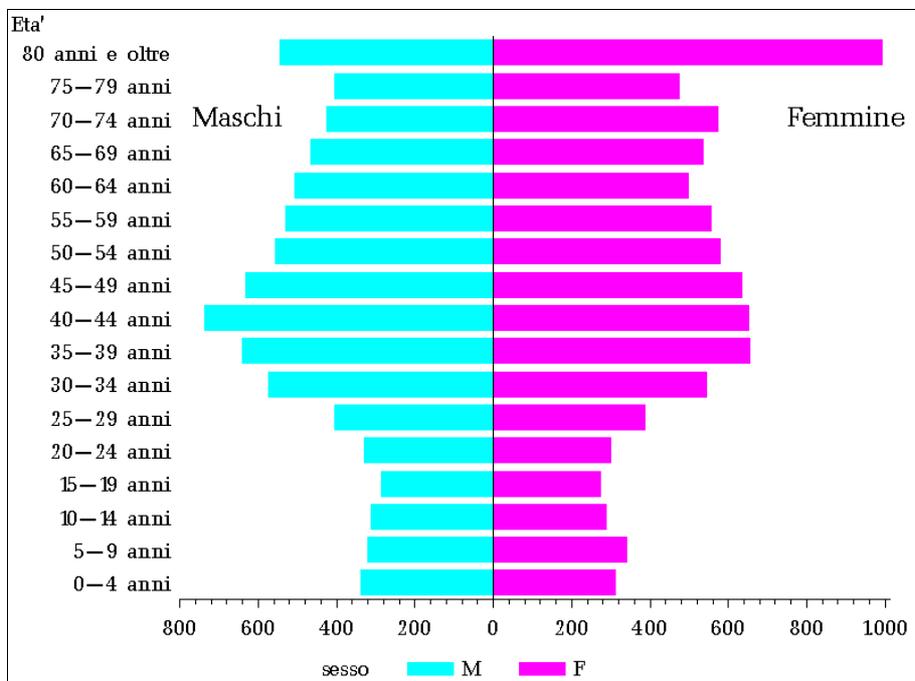


Figura 4. Piramide dell'età della popolazione residente a Bagnacavallo nel corso dell'anno 2009 (fonte Ufficio Statistico Regionale, Regione Emilia Romagna)

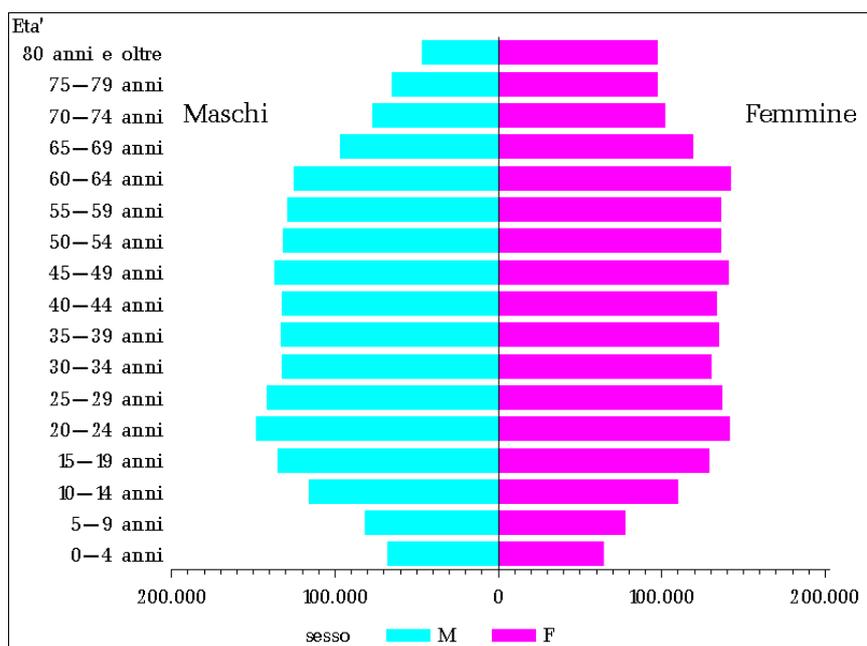


Figura 5. Piramide dell'età della popolazione residente in Emilia Romagna nel corso dell'anno 1988 (fonte Ufficio Statistico Regionale, Regione Emilia Romagna)

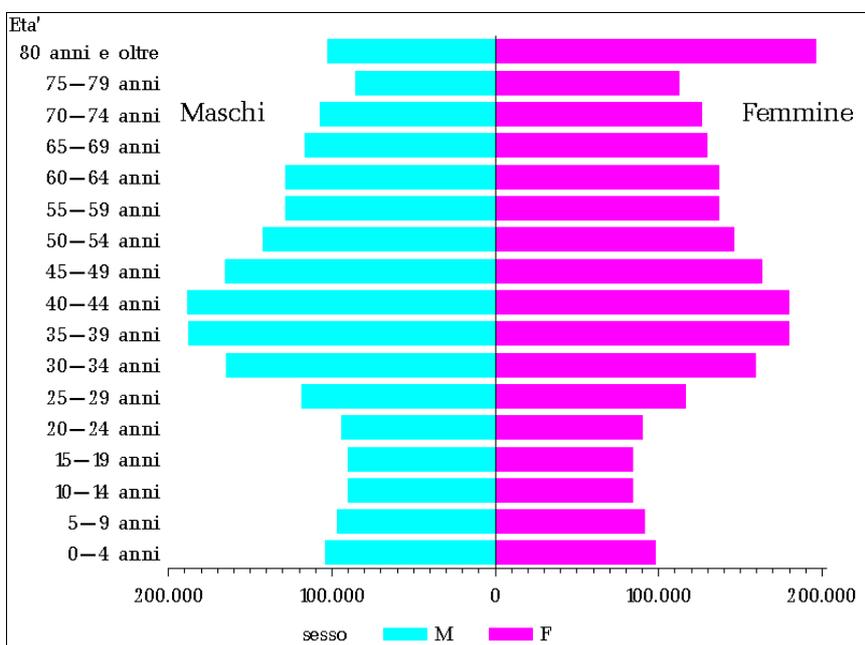


Figura 6. Piramide dell'età della popolazione residente in Emilia Romagna nel corso dell'anno 2009 (fonte Ufficio Statistico Regionale, Regione Emilia Romagna)

Rilievi effettuati

Tutta la popolazione oggetto dello studio è stata convocata per iscritto ad una serie di appuntamenti che prevedevano:

Prelievi ematici:

- Emocromo completo
- Enzimi epatici:
 - Alanina-aminotransferasi (ALT)
 - Aspartato-aminotransferasi (AST)
 - Gamma-glutamilttransferasi (Gamma GT)
 - Bilirubina diretta e indiretta
 - Fosfatasi alcalina (FA)
- INR
- Glicemia
- Protidemia totale
- Insulinemia
- Colesterolemia totale e frazionata
- Trigliceridemia
- HBsAg; Anticorpi anti-HCV

Anamnesi sullo stile di vita, raccolta da personale paramedico appositamente istruito, sulla base di interviste strutturate con particolare riferimento a:

- Assunzione di alcol:
 - sulla base del consumo alcolico dichiarato tramite questionario, si è provveduto a calcolare le unità alcoliche di ogni individuo: 1 unità alcolica (12,5gr di alcol) corrisponde all'assunzione di un bicchiere di vino (0,125 l) o di una lattina di birra (0,33 l) o di un bicchierino di superalcolico (0,04 l). Veniva inoltre distinto il consumo in quotidiano ed occasionale.
- Abitudine al fumo di sigaretta:
 - a seconda della risposta scelta nel questionario strutturato, la popolazione è stata divisa in 5 gruppi sulla base del comportamento nei confronti del fumo: i non fumatori, in completa astensione; coloro che hanno fumato in passato ma attualmente astinenti; coloro che dichiarano meno di 10 sigarette/die, tra le 10 e le 20 sigarette/die, e infine più di 20 sigarette/die.

- Assunzione di tp anti-ipertensiva o anti-diabetica
- Assunzione di droghe
- Tatuaggi o piercing
- Istruzione ed attività lavorativa;
- Attività fisica;

[Per quanto riguarda tale parametro le possibili scelte nel questionario, sulla base delle quali la popolazione è stata suddivisa in gruppi, comprendevano la completa assenza di attività fisica, la pratica per 1-2 volte/settimana, oppure 3-4 volte/settimana, oppure ancora 5-7 volte /settimana. Per volta/settimana si intende un esercizio fisico della durata di almeno 1 ora.]

- Anamnesi familiare;
- Anamnesi epatologica.

Misurazioni antropometriche:

- Circonferenza addominale;
- Peso;
- Altezza;
- Calcolo del BMI
- Pressione arteriosa e frequenza cardiaca.

Valutazioni ecografiche:

A tutti i soggetti con alterazione degli enzimi epatici è stata proposto un approfondimento mediante ecografia epatica per la valutazione della steatosi, secondo i criteri di Saverymuttu (47). Sono stati anche valutati:

- Ectasia delle vie biliari;
- Morfologia e contenuto della colecisti;
- Volume epatico
- Diametro della milza e della vena porta.

Seconda fase

Contemporaneamente al procedere dell'arruolamento (giugno 2006 – dicembre 2009) è stata attivata una seconda fase dello studio che prevedeva una rivalutazione a distanza di tempo (da 6 mesi a due anni) di tutti i soggetti con ipertransaminasemia.

Tale fase comprendeva:

- ripetizione del dosaggio delle transaminasi per confermare o meno l'ipertransaminasemia
- eventuale approfondimento mediante Esami di II° livello:

autoanticorpi (ANA, AMA, ASMA, anti-SLA, anti-LKM); PT; elettroforesi delle proteine sieriche; IgA, IgG, IgM; anti-transglutaminasi; ceruloplasmina; sideremia, transferina e ferritina; funzione tiroidea (TSH, FT4)

- (dove clinicamente indicato): follow up presso gli Ambulatori Specialistici degli Ospedali di Faenza e Lugo ed eventuale Biopsia Epatica.

E' stato inoltre possibile estendere lo studio ecografico del parenchima epatico anche ad un campione casuale di soggetti con transaminasemia nella norma, per un totale di 2633 ecografie.

Analisi statistica

Sono state utilizzate tabelle di contingenza con test del χ^2 secondo Pearson oppure il Fisher's exact test quando appropriati, Anova monovariata con Bonferroni post Hoc test. L'analisi multivariata è stata eseguita con la regressione logistica secondo il disegno Forward Wald. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS 11.0 (SPSS INC Chicago Illinois) installato su un personal computer dotato di Windows XP.

RISULTATI

Al termine dello studio, che si è concluso definitivamente nel marzo 2011, delle 6920 persone contattate per partecipare allo screening, 4026 avevano partecipato, corrispondenti al 58% della popolazione tra i 30 e i 60 anni residente nel comune di Bagnacavallo.

Del campione suddetto il 53% era di sesso femminile, mentre il 47% di sesso maschile. La mediana dell'età per entrambi i sessi era di 48 anni, con un minimo, al momento dell'effettivo ingresso in studio, di 31 anni ed un massimo di 63 anni.

In **Fig. 7** sono riportate le distribuzioni per sesso e fasce d'età.

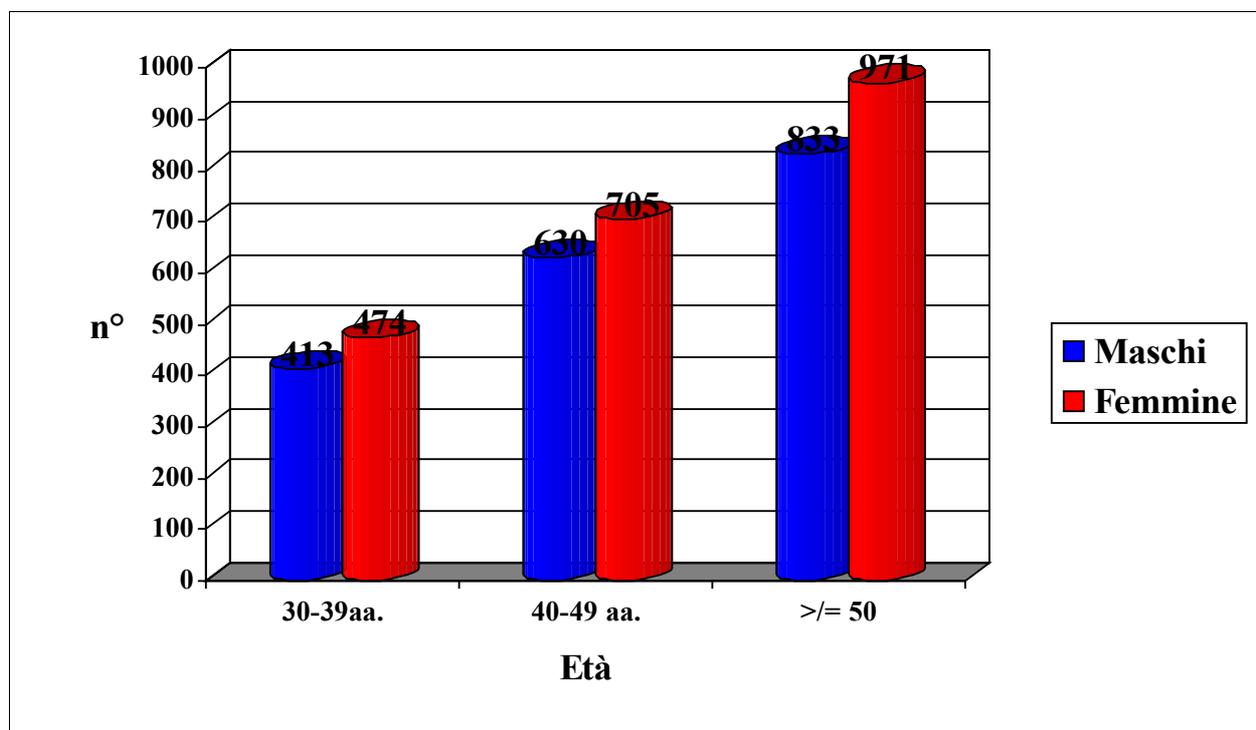
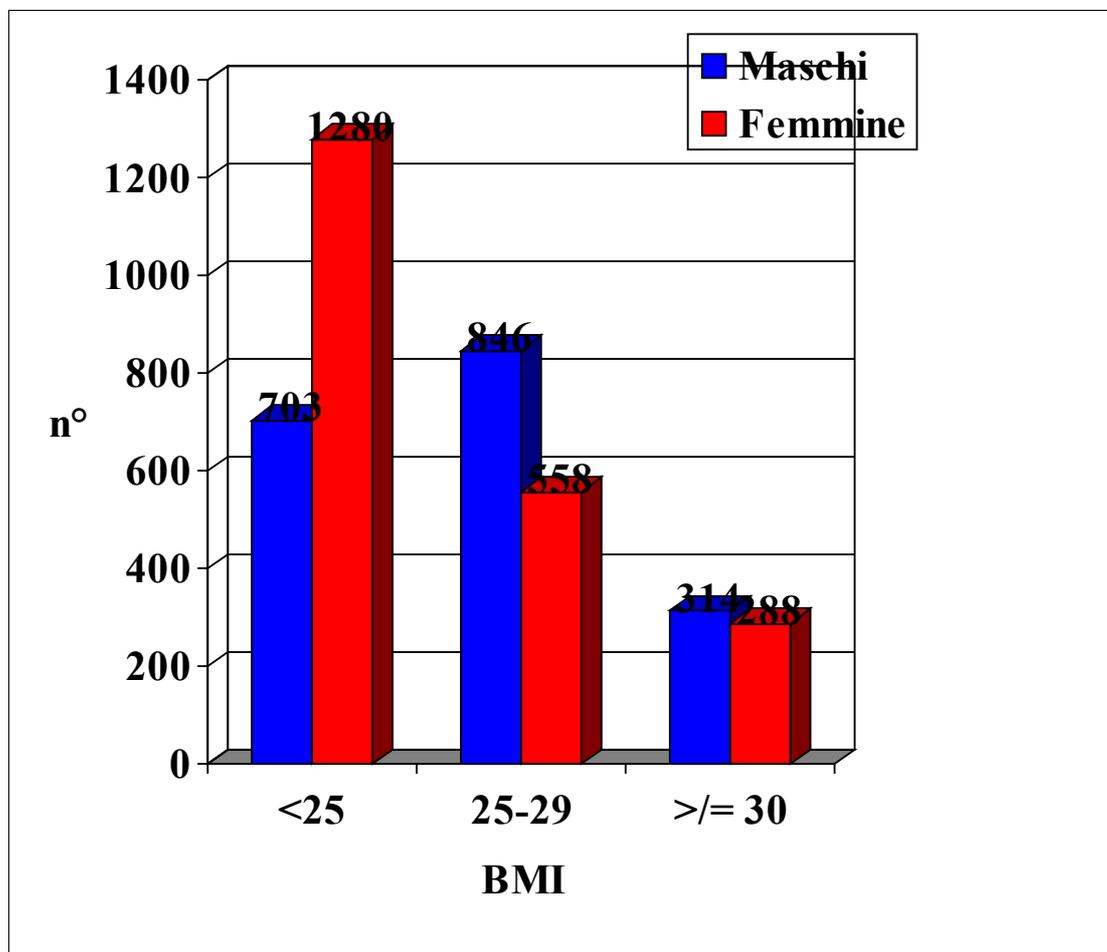


Fig.7

Parametri Clinici

Il calcolo del **BMI**, effettuato mediante rapporto del peso in Kg/altezza (in m)², mostra che circa il 50% della popolazione risultava sovrappeso ossia presentava un BMI ≥ 25 ed un 15% era francamente obeso (BMI ≥ 30). In **Fig.8** è rappresentata la distribuzione dei due sessi nei tre gruppi: BMI < 25; BMI tra 25 e 29; BMI ≥ 30 .



Per quel che riguarda la **Pressione Arteriosa (PA)**, dall'intervista effettuata il 17% del campione era in terapia anti-ipertensiva, ma al momento della misurazione ambulatoriale, il 13.4% presentava valori di Pressione Arteriosa Sistolica (PAS) > 140 mmHg, mentre il 12.3% aveva valori > 90 mmHg per la Pressione Diastolica (PAD). Un'osservazione interessante deriva dalla valutazione degli stessi dati nel momento in cui sono stati modificati i parametri di riferimento. Applicando infatti come cut off i limiti indicati nell'ambito dei criteri diagnostici per la Sindrome Metabolica secondo l'American Heart Association (87) le percentuali di soggetti con valori di PA elevati aumentava significativamente. Tale variazione è visivamente riportata nel grafico in **Fig. 9 e 10**

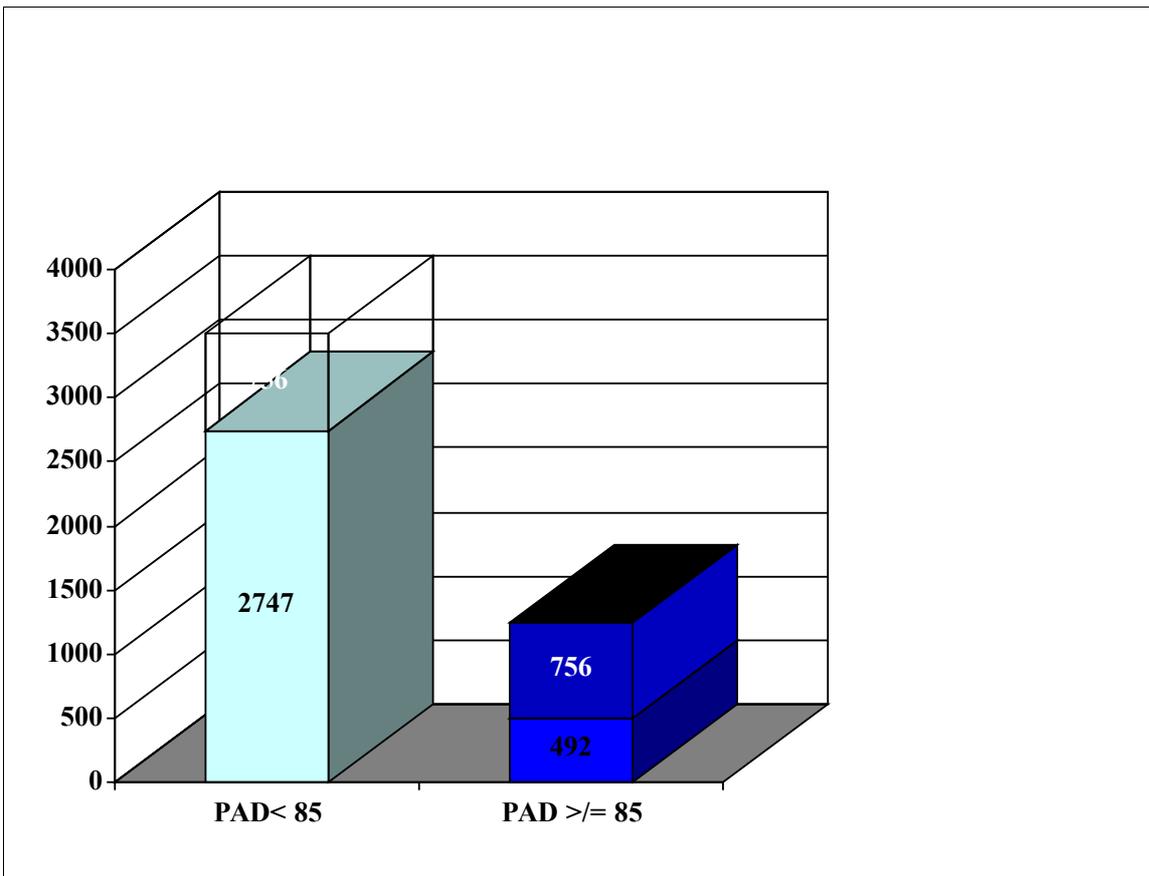
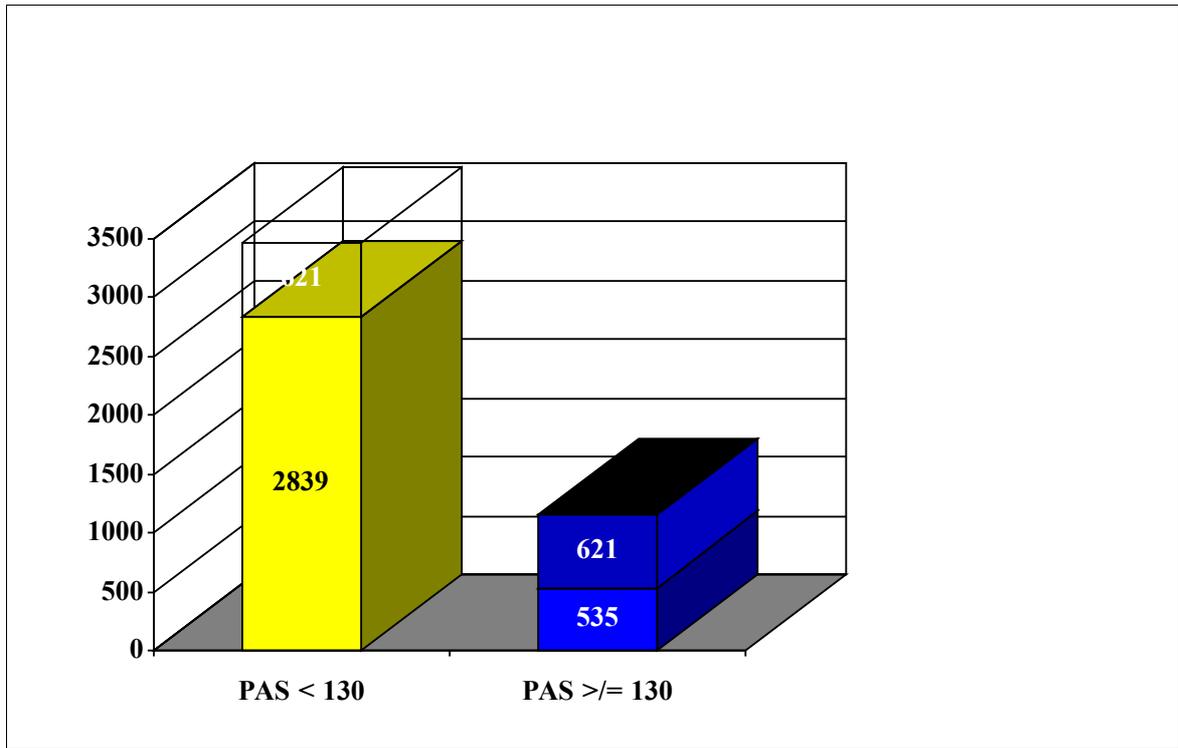


Fig. 9 e 10*Campione di 3995 soggetti; missing 31

Relativamente al **Diabete**, risultava in tp ipoglicemizzante o dietetica per diabete il 3% del campione, mentre considerando i livelli di glicemia a digiuno il 5.6% aveva valori ≥ 100 mg/dl (considerando anche in questo caso il limite di riferimento dei criteri dell'AHA per la SM).

Per quel che concerne il **Fumo**, il 50% dei partecipanti dichiarava di non aver mai fumato, mentre 24% costituivano il gruppo degli ex-fumatori; il 26% fumava invece almeno una sigaretta al dì. In **Tabella 2** è riportata la suddivisione tra i due sessi e il numero di sigarette fumate.

	MAI FUMATO	EX FUMAT.	≤ 10 SIG/DIE	10 – 20 SIG/DIE	> 20 SIG/DIE	TOT
Maschi	805	543	182	214	107	1851
Femmine	1172	417	267	198	69	2123
TOT	1977	960	449	412	176	3974*

Tab. 2: *missing 52

Infine si segnala che nella popolazione analizzata la prevalenza per gli **Anticorpi Anti-HCV** risultava essere dell'1% (42 casi) mentre la positività dell'**HBsAg** è stata rinvenuta nello 0.5% (20 soggetti).

Sindrome Metabolica

Utilizzando i criteri dell'AHA (87) è stato possibile diagnosticare la Sindrome Metabolica in una percentuale elevata della popolazione, pari al 32%. La distribuzione nei due sessi è riportata in Fig.11

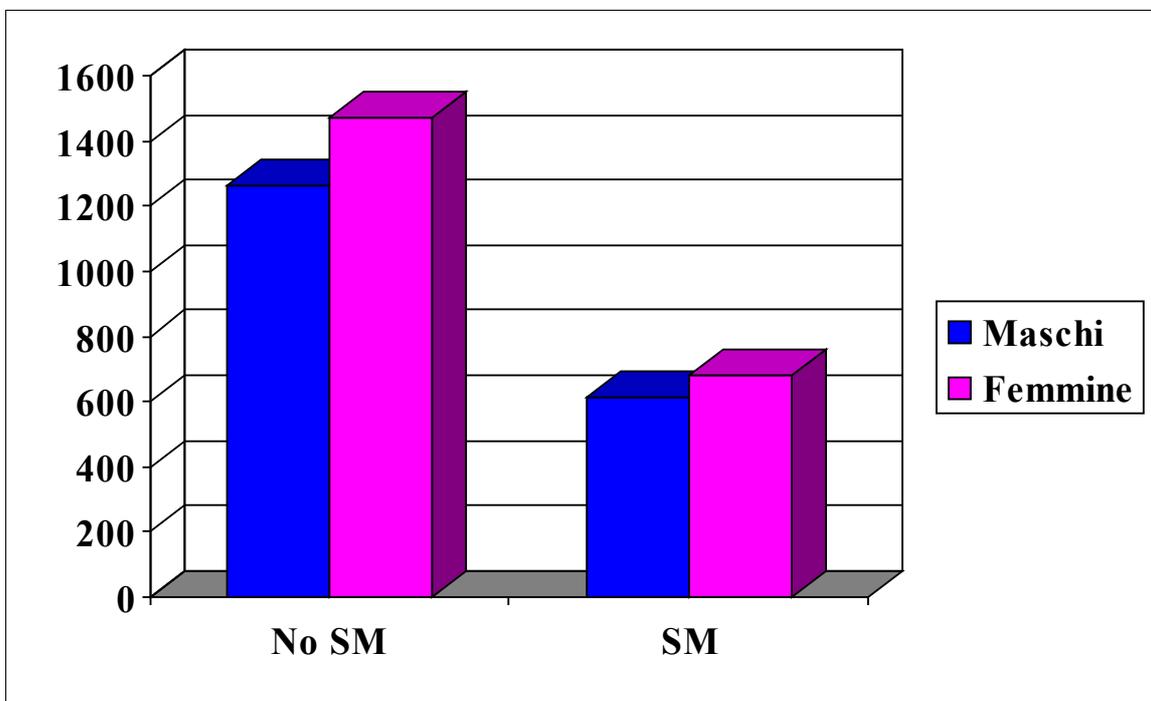


Fig.11: No SM Maschi 31.3%; No SM Femmine 36.9%. SM Maschi 15.3%; SM Femmine 16.9%

Ipertransaminasemia

Il 10.4% della popolazione presentava un incremento delle transaminasi, rappresentato da un 9.8% di alterazione delle ALT isolate (7.3%) o in associazione alle AST (2.5%) e da una piccola frazione di incremento isolato delle AST (0.6% della popolazione). Questo dato si otteneva considerando valori "normali" per ALT e AST quelli di riferimento del laboratorio, ossia < 40 UI/L. Andando a modificare i parametri sulla base della recente letteratura (13) e ponendo quindi come cut off 35 UI/L per il sesso maschile e 25 UI/L per quello femminile, la percentuale, soprattutto tra le donne, aumentava notevolmente. Tale variazione è schematizzata in Fig. 12.

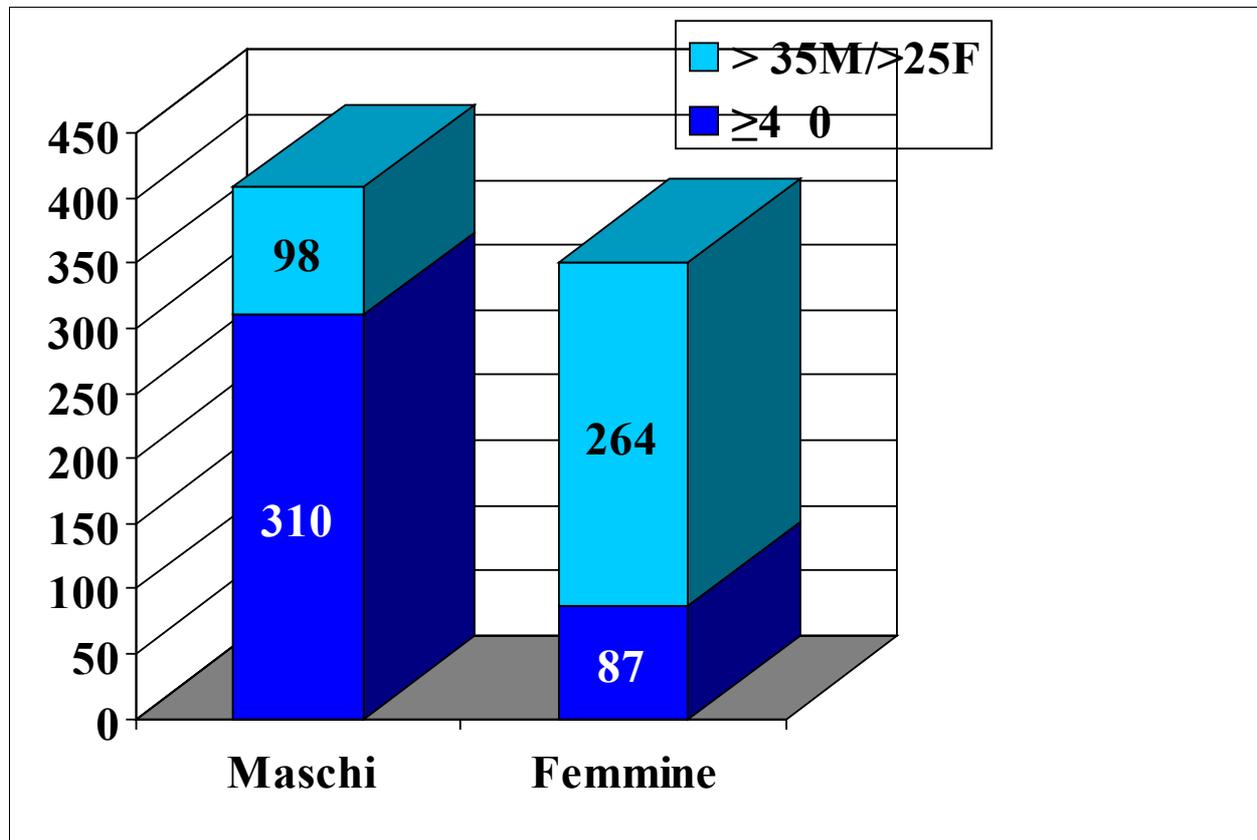


Fig. 12

All'interno del gruppo con livelli di ALT dosati sopra i limiti della norma, si sono poi andate a valutare le cause di tale incremento. Come atteso, la diagnosi maggiormente rappresentata (pur se presuntiva, non essendo possibile eseguire biopsie in tutti i pazienti) è stata la **NAFLD/NASH** (6.8% di prevalenza), a cui faceva seguito l'epatopatia alcolica isolata (0.3%) o associata a componente metabolica (1.4%), quindi l'epatopatia HCV-relata (0.6%), l'HBV-relata (0.2%) ed uno 0.3% di altre cause comprensive di epatopatia autoimmune, cirrosi biliare primitiva, malattia celiaca, emocromatosi e risentimento epatico in corso di tiroidite. Era presente uno 0.2% di ipertransaminasemie definite "criptogenetiche" in quanto non associate a steatosi epatica e ad alterazioni clinico-laboratoristiche rilevate

Per quel che riguarda le correlazioni, considerando due popolazioni definite rispettivamente G1 caratterizzata da livelli di ALT alterati e G2 con livelli invece nella norma, l'analisi statistica ha permesso di evidenziare una significatività nelle differenze tra i due gruppi in merito a numerosi parametri. Una sintesi è riportata in **Tabella 3**.

	G1 n° 396	G2 n° 3630	P
% Maschi	78	22	< 0.001
Bilirubina (mg/dl)	0.71	0.65	0.001
gammaGT (UI/L)	61	21	0.001
Piastrine (x 10³/ml)	230	245	0.001

Tab. 3

Correlazione significativamente positiva si è rilevata anche tra livelli di ALT e BMI ($p < 0.0001$); viceversa una correlazione negativa si è evidenziata tra l'incremento delle ALT (ma anche delle gammaGT) e il fumo di sigaretta ($p < 0.003$ per le ALT e $p < 0.006$ per le gammaGT).

Consumo Alcolico

Nella popolazione oggetto di studio si sono dichiarati consumatori quotidiani di alcolici il 29% del totale, mentre consumatori occasionali erano il 44%. Il 27% risultava completamente astinente. Il vino è risultato la bevanda maggiormente consumata.

La suddivisione per sesso ed assunzione alcolica è riassunta in **Figura 13**.

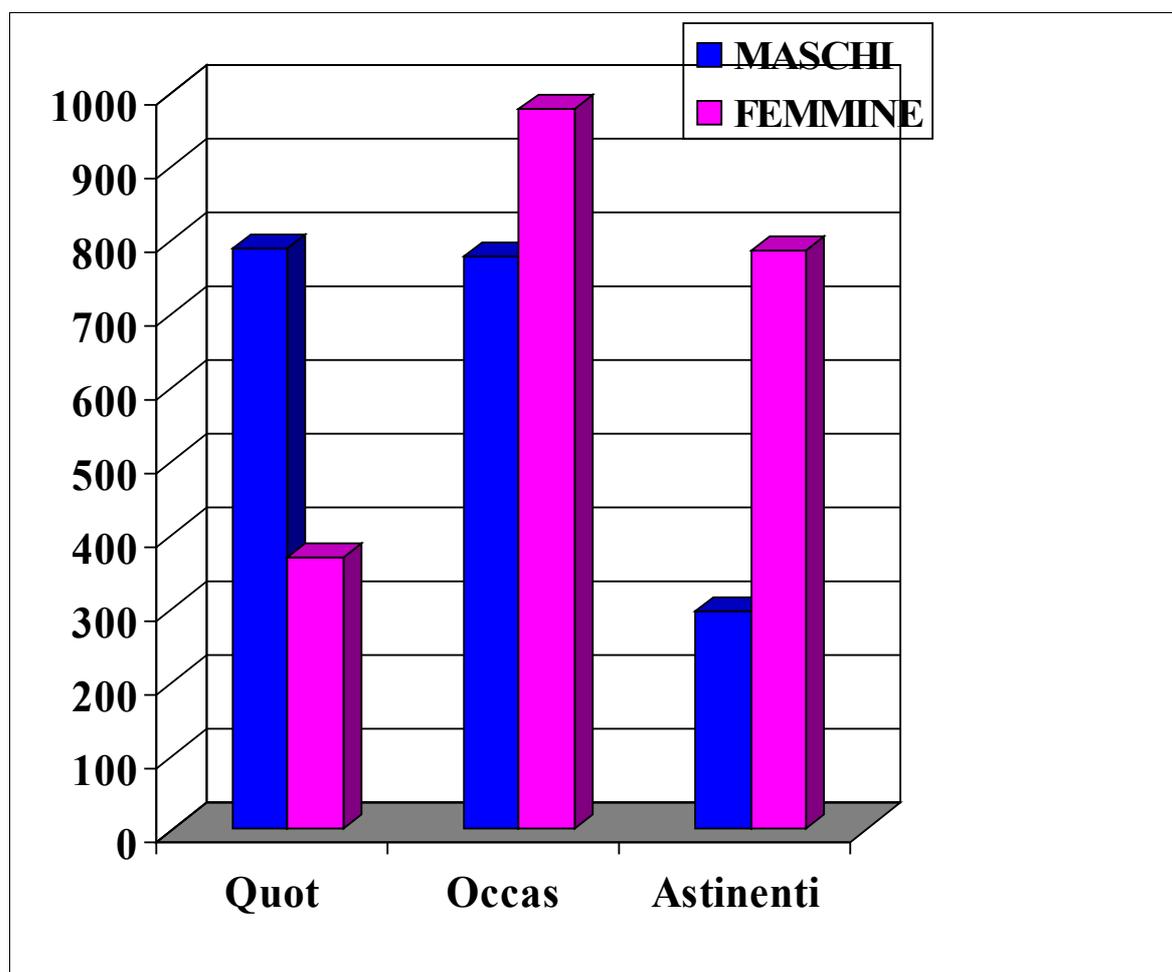


Fig. 13: * Dato disponibile su 3993 soggetti; missing 33

Steatosi Ecografica

Infine è stata valutata, su tutta la popolazione di soggetti con alterazione degli enzimi epatici più un campione di partecipanti con valori enzimatici nella norma, la presenza di Steatosi Epatica ecografica e sua gradazione secondo i criteri di Saverymuttu (47). Su un totale quindi di 2633 ecografie è risultata una prevalenza di steatosi del 37%; è stato anche possibile riscontrare uno 0.3% di cirrosi (9 casi). La distribuzione dei vari gradi di steatosi è osservabile in **Figura 14**.

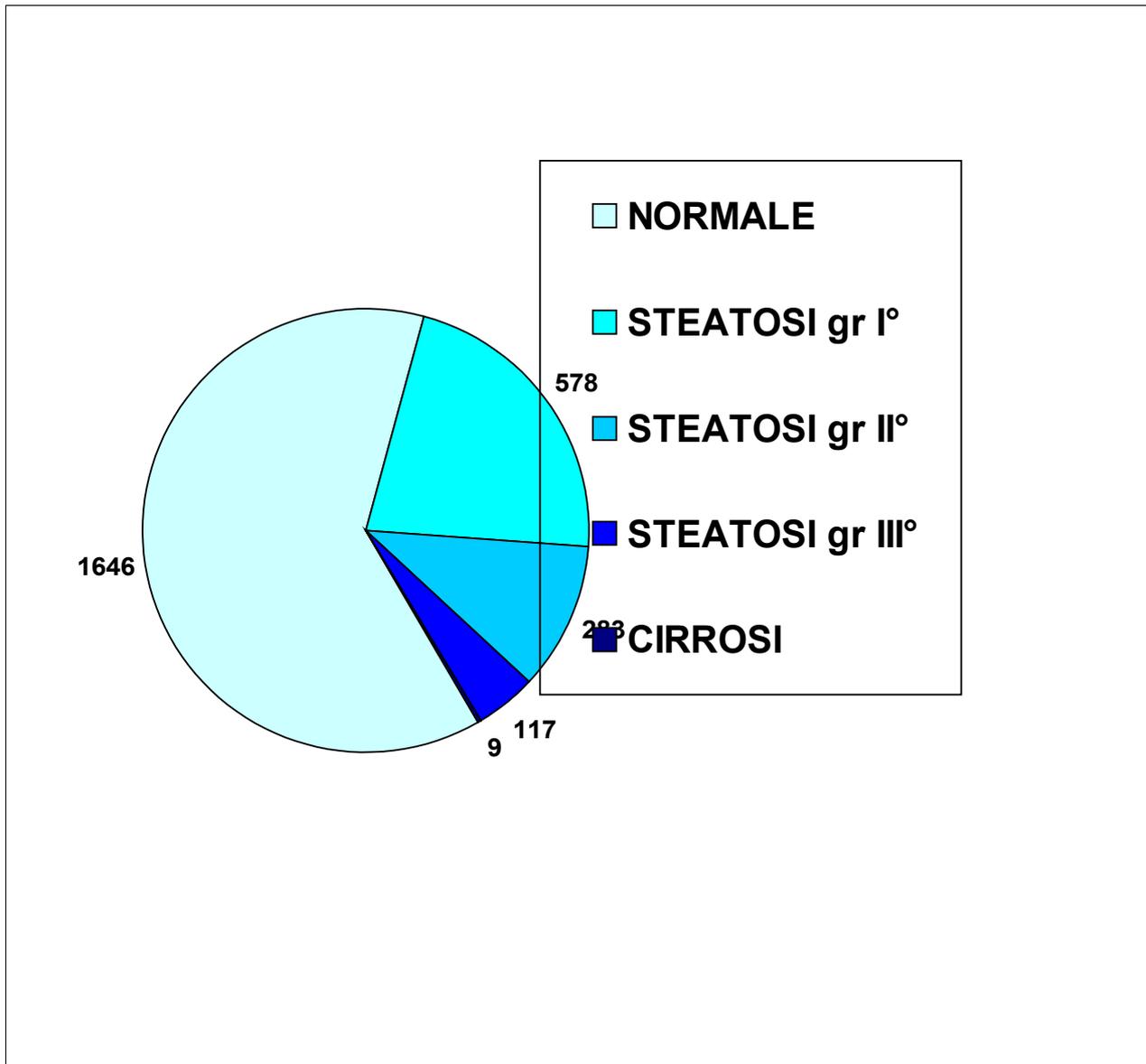


Fig 14: Normale 62.5%; Steatosi I° grado 22%; steatosi II° grado 10.7%; steatosi III° grado 4.4%; cirrosi 0.3%

La presenza di steatosi ed il grado sono risultate correlate in maniera statisticamente significativa con numerosi parametri: enzimi epatici (ALT, AST, bilirubina e fosfatasi alcalina), glicemia, colesterolo totale e HDL (correlazione negativa); BMI e circonferenza addominale.

La presenza/assenza di steatosi è stata associata anche alla alterazione o meno delle ALT evidenziando che nel caso di reperto ecografico normale solo il 5% dei soggetti presentava l'ipertransaminasemia, percentuale che sale al 50% nelle steatosi di III° grado (Fig. 15)

La stessa valutazione è stata fatta anche considerando limiti più bassi per le ALT nei due sessi. (Fig 16)

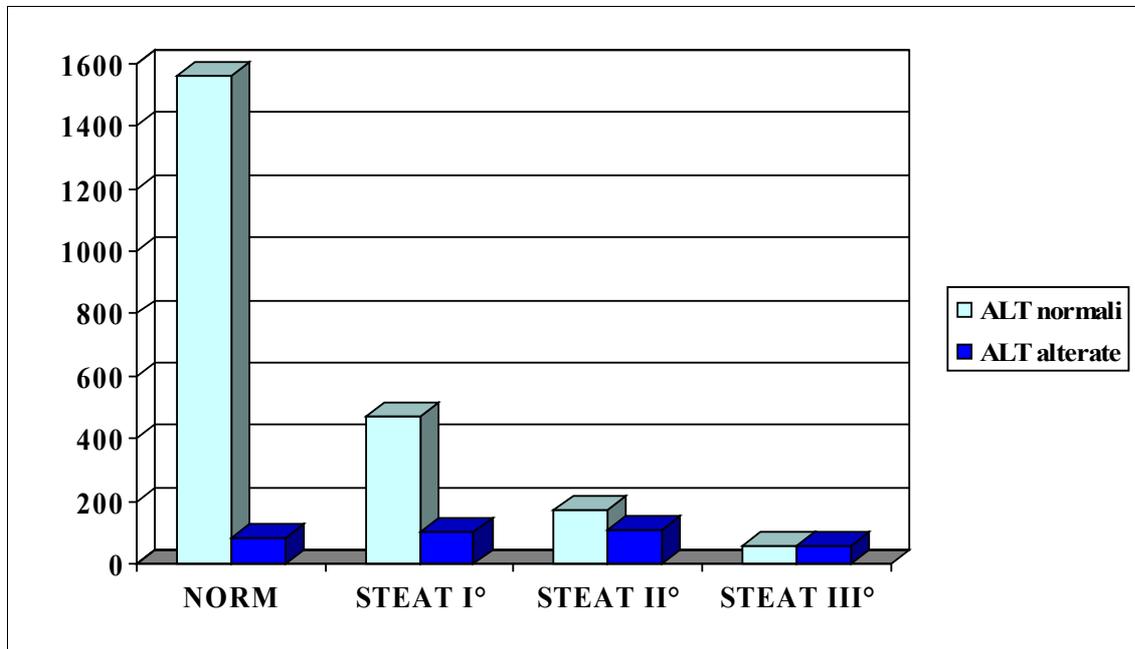


Fig 15

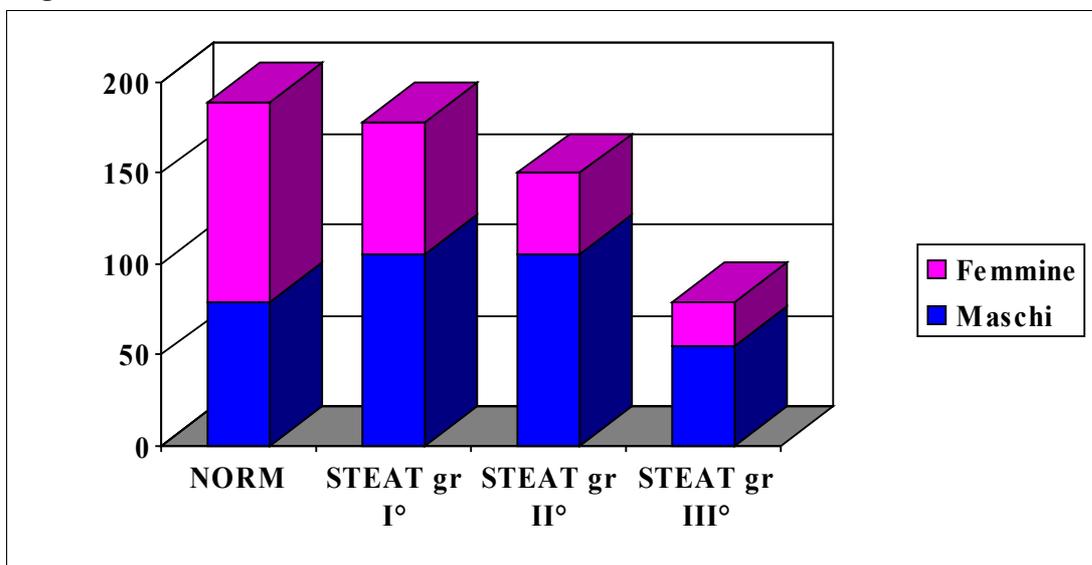


Fig 16: considerando ALT normali ≤ 35 per maschi e ≤ 25 per le femmine, prevalenza di ALT alterate con ecografia Normale 11.5%, Steatosi I° gr. 31%, steatosi II° grado 53%, steatosi III° grado 67.5%

CONCLUSIONI

Lo studio di popolazione effettuato su 4026 soggetti di età compresa tra i 30 e i 60 anni, residenti nel comune di Bagnacavallo (RA), ha evidenziato che la prevalenza dell'ipertransaminasemia da tutte le cause si attesta attorno al 10% ed è per lo più identificabile con un incremento delle ALT (95% delle ipertransaminasemie).

Tra le cause prevalenti di aumentati livelli enzimatici, la diagnosi prevalente, purchè presuntiva, risulta essere la NAFLD/NASH (69% delle diagnosi), dato atteso in quanto conferma quelli riportati dalla letteratura. Ovviamente per motivi etici e clinici non è stato possibile procedere in tutti i casi a biopsia epatica e la diagnosi è stata posta sulla base del riscontro ecografico, sui parametri antropometrici e laboratoristici e, quando possibile, sulla base della risposta agli interventi terapeutici nella fase di follow up.

La seconda causa prevalente di ipertransaminasemia risulta essere l'epatopatia alcolica, associata o meno alla componente metabolica (rispettivamente 15% e 3.5% dei casi con ALT alterate).

Le infezioni da HCV e HBV appaiono responsabili rispettivamente dello 0.6% e dello 0.2% delle ipertransaminasemie nella popolazione generale, mentre la prevalenza di positività per gli Anticorpi anti-HCV si assesta, dai nostri dati, attorno all'1% e per l'HBsAg allo 0.5%. Tale riscontro risulta inferiore di circa il 50% rispetto ai più recenti dati di letteratura, considerando campioni di popolazione di pari età e nell'area del Nord Italia. Potrebbe trattarsi dell'evidenza di un trend in calo delle due principali cause virali di epatopatia.

Anche dai nostri dati si conferma la correlazione significativa delle ALT con numerosi parametri metabolici e clinici, a sostegno del ruolo di questo semplice esame laboratoristico come primo "screening" per evidenziare problematiche di tipo epatologico e non solo.

Per quel che concerne i parametri antropometrici, il 50% della popolazione valutata in screening è risultata in sovrappeso ed un 15% francamente obeso, mentre era possibile porre diagnosi di Sindrome Metabolica in oltre il 30% dei soggetti. Il dato, anch'esso noto dalla letteratura, conferma il pericoloso incremento dei disturbi alimentari e metabolici nei paesi occidentali, Italia compresa. Significativo in questo senso è anche il riscontro, sul campione di 2633 ecografie, di una prevalenza del 37% di steatosi epatica.

L'associazione del dato ecografico a quello laboratoristico ha permesso di verificare come in presenza di ecografia negativa per steatosi, solo il 5% dei soggetti presentasse ALT alterate, percentuale che raggiungeva il 50% in presenza di steatosi di III° grado.

Un'ultima considerazione riguarda i cut off attualmente consigliati nei principali lavori scientifici per stabilire i livelli di "normalità" delle ALT. Nella nostra analisi, riducendo i limiti superiori da 40 UI/L (valore di riferimento del nostro laboratorio) a 35 UI/L per il sesso maschile e 25 UI/L per quello femminile, ne risultava una prevalenza di ipertransaminasemie nella popolazione pari al 18%, soprattutto per un netto aumento dei casi nel sesso femminile. Anche la correlazione con la steatosi ecografica risultava in percentuali di alterazioni enzimatiche più elevate, dove questo incremento risultava via via crescente all'aumentare del grado di steatosi considerato.

Non è per ora ancora noto, dalle nostre analisi, se tali variazioni possano significativamente associarsi o meno a un aumento di sensibilità diagnostica dell'ipertransaminasemia nei confronti di epatopatie e NAFLD.

PROSPETTIVE

Il database risultante dalla raccolta dati del "Progetto Bagnacavallo" costituisce una fonte estremamente voluminosa di dati che dovrà essere ulteriormente esplorata ed analizzata per trarne nuove correlazioni e spunti di ricerca sia per le conoscenze attuali sia, come speriamo, anche per gli anni a venire.

E' anche in quest'ottica che è stato intrapreso un programma di follow up che dovrebbe proseguire nel corso dei prossimi anni sia nell'ambito degli ambulatori specialistici sia tramite la collaborazione dei medici di medicina generale sul territorio, al fine di monitorare a lungo termine tutti i pazienti con epatopatia in atto o potenziale identificati in corso di studio e al contempo ottenere dati per valutazioni prospettiche.

Ci auguriamo che tale progetto possa essere caratterizzato dallo stesso entusiasmo e dagli stessi risultati in termini di partecipazione con cui si è svolto in questi anni e che possa costituire un beneficio per la popolazione coinvolta così come un piccolo ma significativo contributo scientifico.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Richard M. Green and Steven Flamm. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology* 2002;123:1367–1384
- 2 Goldberg DM. Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 1980;12(1):1-58
- 3 Ray Kim W., Flamm S.L., et al Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as indicator of health and disease. *Hepatology* 2008 47(4): 1363-70
- 4 Siest G.m, Schiele F, Galteau M et al. Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities in plasma: statistical distributions, individual variations and reference values. *Clin Chem* 1975; 21:1077-1087
- 5 Salvaggio A, Periti M, Miano L et al Body Mass Index and liver enzyme activity in serum. *Clin Chem* 1991;37: 720-723
- 6 Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F et al Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors and for patient with chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. *Hepatology* 1998; 27: 1213-1219
- 7 Mathiesen U, Franzen L, Fryden A, et al The clinical significance of slightly to moderately increased transaminase values in asymptomatic patients. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 85-91
- 8 The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase : potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1018-22
- 9 Diehl AM, Potter J, Boitnott J et al Relationship between pyridoxal 5- phosphate deficiency and aminotransferase levels in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1984; 86: 632-636
- 10 Niemelä O, Alatalo P. Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010 Sep;70(5):305-12.
- 11 Clark JM, Brancati FL, Diehl AM The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 960-967
- 12 Zhang H, Jiang y, He S et al Etiology and prevalence of abnormal serum alanine aminotransferase levels in a general population in Northeast China. *Chin Med J* 2011; 124: 2661-68
- 13 Lee JK, Shim JH, Lee HC, Lee SH, Kim KM, Lim YS, et al. Estimation of the healthy upper limits for serum alanine aminotransferase in Asian populations with normal liver histology. *Hepatology* 2010; 51: 1577-1583.
- 14 Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002; 137: 1-10.
- 15 Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol.* 2001;35(4):531-7.
- 16 Pendino GM, Mariano A, Surace P, Caserta CA, Fiorillo MT, Amante A, Bruno S, Mangano C, Polito I, Amato F, Cotichini R, Stroffolini T, Mele A; ACE Collaborating Group. Prevalence and etiology of altered liver tests: a population-based survey in a Mediterranean town. *Hepatology* 2005; 41: 1151-59
- 17 Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556–562.
- 18 Darwish MA, Faris R, Clemens JD, Rao MR, Edelman R. High seroprevalence of hepatitis A, B, C, and E viruses in residents in an Egyptian village in The Nile Delta: a pilot study. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:554–558.

- 19 Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, Sodde M, Fratti N, De Martin C, Cristianini G. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology*. 1994 Dec;20(6):1442-9.
- 20 Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol*. 2001 Oct;35(4):531-7.
- 21 Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006;45:529–38.
- 22 Zani C, Pasquale L, Bressanelli M, Puoti M, Paris B, Coccaglio R, Lascioli I, Pieriacci G, Donato F. The epidemiological pattern of chronic liver diseases in a community undergoing voluntary screening for hepatitis B and C. *Dig Liver Dis*. 2011 Aug;43(8):653-8.
- 23 Maio G, d'Argenio P, Stroffolini T, Bozza A, Sacco L, Tosti ME, Intorcia M, Fossi E, d'Alessio G, Kondili LA, Rapicetta M, Mele A. Hepatitis C virus infection and alanine transaminase levels in the general population: a survey in a southern Italian town. *J Hepatol*. 2000 Jul;33(1):116-20.
- 25 Osella AR, Misciagna G, Leone A, Di Leo A, Fiore G. Epidemiology of hepatitis C virus infection in an area of Southern Italy. *J Hepatol* 1997; 27: 30- 5.;
- 26 Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M, Costantino A, Kondil LA, Menniti-Ippolito F, et al. Prevalence, risk factors and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in Southern Italy. *Hepatology* 1997; 26: 1006--11.
- 27 Stroffolini T, Guadagnino V, Chionne P, Procopio B, Mazzuca EG, Quintieri F, et al. A population based survey of hepatitis B virus infection in a southern Italian town. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:415–418.
- 28 Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, Saveria Crocè L, Sasso F, Pozzato G, Cristianini G, Brandi. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut*. 1997 Dec;41(6):845-50.
- 29 Corrao G et al. Are the recent trends in liver cirrhosis mortality affected by the changes in alcohol consumption? Analysis of latency period in European countries. *J Stud Alcohol* 1997; 58:486-94
- 30 Mendenhall CL. Anabolic steroid therapy as an adjunct to diet in alcoholic hepatic steatosis. *Am J Dig Dis* 1968; 13: 783-91
- 31 Scaglioni F, Ciccia S, Marino M, Bedogni G, Bellentani S. ASH and NASH. *Dig Dis*. 2011;29(2):202-10.
- 32 Levitsky J, Maillard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Sem Liver Dis* 2004;24: 233-47
- 33 Pessione F et al. Five year survival predictive factors in patients with excessive alcohol intake and cirrhosis. Effect of alcoholic hepatitis, smoking and abstinence. *Liver Int* 2003;23:45-53
- 34 Borowsky SA, Strome S, Lott E. Continued heavy drinking and survival in alcoholic cirrhotics. *Gastroenterology* 1981; 80:1405-09
- 35 Luca A et al. Effects of ethanol consumption on hepatic hemodynamics in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 112:1284-1289
- 36 Bird GL, Williams R. Factors determining cirrhosis in alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med* 1988; 10: 97-105
- 37 Savolainen V et al. Early perivenular fibrogenesis – precirrhotic lesions among moderate alcohol consumers and chronic alcoholics. *J Hepatol* 1995; 23: 524-31
- 38 MacSween RN, Scott AR. Hepatic cirrhosis: a clinico-pathological review of 520 cases. *J Clin Pathol* 1973; 26: 936-42

- 39 Wechsler H, Austin SB. Binge drinking: the five/four measure. *J Stud Alcohol* 1998; 59: 122-124
- 40 Ceccanti M, Attili A, Balducci G, Attilia F, Giacomelli S, Rotondo C, Sasso GF, Xirouchakis E, Attilia ML. Acute alcoholic hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 833-841
- 41 Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology* 2007; 46: 2032-2039
- 42 Becker U, Grønbaek M, Johansen D, Sørensen TI. Lower risk for alcohol-induced cirrhosis in wine drinkers. *Hepatology* 2002; 35: 868-875
- 43 C. Loguercio, A. Federico, C. Bianchi et al Drinking habits and risk of altered liver enzymes in the general population of a rural area in Southern Italy *Dig Liv Dis* 39 (2007) 748–752
- 44 Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, La Vecchia C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev Med* 2004;38:613–9.
- 45 Saadeh S et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 745-750.
- 46 Mancini M et al Sonographic hepatic-renal ratio as indicator of hepatic steatosis: comparison with H-magnetic resonance spectroscopy. *Metabolism* 2009; 58: 1724-1730.
- 47 Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *British medical journal* vol. 292, 1986, pp. 13-5.
- 48 Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, Kato T, Takeda N, Okuda J, Ida K, Kawahito Y, Yoshikawa T, Okanoue T. 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
- 49 Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):155-61.
- 50 Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346: 1221-31
- 51 Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005 Jul;42(1):44-52.
- 52 Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol*. 2008;43: 509-18
- 53 Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease *QJM*. 2010;103: 71-83
- 54 Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2008;75: 721-8
- 55 Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*. 2009;13: 9-19
- 56 Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S, Bugianesi E, Grieco A, Fargion S, Gasbarrini A, Loguercio C, Lonardo A, Marchesini G, Marra F, Persico M, Prati D, Baroni GS; NAFLD Expert Committee of the Associazione Italiana per lo studio del Fegato. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis*. 2010;42: 272-82
- 57 Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update *World J Gastroenterol*. 2008;14:185-92
- 58 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome *Diabetes*. 2001;50: 1844-50;

- 59 Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology*. 2006;130: 207-10
- 60 Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease *QJM*. 2010;103: 71-83
- 61 Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis *Hepatology*. 2007;45: 1366-74
- 62 Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc*. 2010;69: 211-20
- 63 Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes *Hepatology*. 2006;44: 865-73
- 64 Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem*. 2007;18: 184-95
- 65 Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, Younossi ZM. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7: 234-8
- 66 Tarantino G, Saldamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrom. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22: 293-303
- 67 Andersen ES, Christensen PB, Weis N. Transient elastography for liver fibrosis diagnosis. *Eur J Intern Med*. 2009;20: 339-42
- 68 Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;134:1670-81
- 69 Bonekamp S, Kamel I, Solga S, Clark J. Can imaging modalities diagnose and stage hepatic fibrosis and cirrhosis accurately? *J Hepatol*. 2009;50: 17-35
- 70 Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol*. 2005;42: S22-36
- 71 Rockey DC, Bissell DM. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology*. 2006;43: S113-20
- 72 Goyal N, Jain N, Rachapalli V, Cochlin DL, Robinson M. Non-invasive evaluation of liver cirrhosis using ultrasound. *Clin Radiol*. 2009;64: 1056-66
- 73 Hübscher SG Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*. 2006;49: 450-65.
- 74 Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, Bedossa P, Belghiti J. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology*. 2009;49: 851-9.
- 75 Kylin E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyka "mie-Hyperurika" miesyndrom. *Zentralblatt fuer Innere Medizin*, 44: 105-127, 1923.
- 76 Vague J, Combes R, Tramon M, et al In medical complications of obesity. London, Academic Press, 1979
- 77 Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* ;37: 1595-1607, 1988
- 78 Eckel R H, Grundy S M, Zimmet P Z The Metabolic Syndrome. *Lancet*, 365; 1415-28, 2005
- 79 Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y et al The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb*, 12: 295-300, 2005
- 80 Alberti K and Zimmet P Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO consultation. *Diabetic Med*, 15: 539-553, 1998.
- 81 Balkau B, Charles M A Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for

the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Diabet Med*, 16: 442-43, 1999

82 Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 285: 2486-97, 2001

83 American College of Endocrinology Task Force on the Insulin Resistance Syndrome: American College of Endocrinology Position Statement on the Insulin Resistance Syndrome. *Endocr Pract*, 9: 236-52, 2003

84 Zimmet P, Alberti KG and Shaw J Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782-7, 2001

85 Lemieux I, Pascot A, Couillard C et al. Hypertriglyceridemic waist: a marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? *Circulation*, 102: 179-84, 2000.

86 The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. International Diabetes Federation, 2005

87 Alberti K, Eckel R, Grundy, SM, Zimmet P, Cleeman CJ, Donato KA, Fruchart JC, James P, Loria CM, Smith SC. A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120: 1640-1645

88 Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005; 143: 722-728

89 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219

90 Ki-Jarvinen H. Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med* 2005; 37: 347-356

91 Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, Siqueira AC, Braga H, Freitas LA. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hum Nutr Diet* 2005; 18: 365-370

92 McMillan KP, Kuk JL, Church TS, Blair SN, Ross R. Independent associations between liver fat, visceral adipose tissue, and metabolic risk factors in men. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32: 265-272

93 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845

94 Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003; 300: 1140-1142

95 Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005; 307: 384-387

96 Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 17-26 (50-57)

97 Robinson D, Whitehead TP. Effect of body mass and other factors on serum liver enzyme levels in men attending for well population screening. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 393-400

98 Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG. Gamma-glutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 699-708

99 Perry IJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective study of serum gamma-glutamyltransferase and risk of NIDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 732-737

100 Yamada J, Tomiyama H, Yambe M, Koji Y, Motobe K, Shiina K, Yamamoto Y, Yamashina A. Elevated serum levels of alanine aminotransferase and gamma glutamyltransferase are markers of inflammation and oxidative stress independent of the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2006; 189: 198-205

101 Stranges S, Trevisan M, Dorn JM, Dmochowski J, Donahue RP. Body fat distribution, liver enzymes, and risk of hypertension: evidence from the Western New York Study. *Hypertension* 2005; 46: 1186–1193