



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA CAMPANIA "LUIGI VANVITELLI"

Dipartimento di Salute Mentale e Fisica e Medicina Preventiva

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI
(CICLO XXXIV)**

Tesi sperimentale di Dottorato

(Settore scientifico-disciplinare MED/12)

**Ambiente e genetica nella patogenesi ed influenza sull'outcome
terapeutico della non-alcoholic fatty liver disease**

**Coordinatore
Ch.ma Prof.ssa Armida Mucci**

**Tutor
Ch.mo Prof. Alessandro Federico**

**Candidato
Dott. Marcello Dallio**

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

A Maddalena, Zaira e Flavia

*La ricerca scientifica oltre un impercettibile confine diventa responsabilità oggettiva
dell'Uomo prima che del Medico*

Indice

Capitolo I: la non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

1.1 Definizione	p.6
1.2 Epidemiologia	p.7
1.3 La storia naturale	p.7
1.4 La patogenesi e ruolo dei single nucleotide polimorfisms (SNPs)	p.8
1.5 NAFLD e sindrome metabolica	p.15
1.6 NAFLD, insulino resistenza e obesità	p.16
1.7 NAFLD e diabete mellito tipo 2	p.18

Capitolo II: gli interferenti endocrini nelle malattie metaboliche: patologia molecolare

2.1 Definizione ed interesse biologico degli interferenti endocrini	p.21
2.2 Classificazione degli interferenti endocrini	p.22
2.3 Il bisfenolo A	p.23
2.4 Meccanismi di azione biologica del bisfenolo A	p.26
2.5 Metodologie analitiche per la determinazione del bisfenolo A	p.31

Capitolo III: nuovi approcci terapeutici, la silibina

3.1 “Drug in context” e definizione	p.36
3.2 Studi pre-clinici	p.37
3.3 Studi clinici	p.39

Capitolo IV: studio sperimentale

4.1 Scopo dello studio	p.41
4.2 Materiali e metodi coorte I	p.42
4.2 a Pazienti	p.42
4.2 b Saggi di laboratorio e analisi nutrizionale	p.43
4.2 c Test di proliferazione cellulare e test TBARS	p.45
4.2 d Trattamento con BPA delle cellule HepG2 incubate con acidi grassi	p.46

4.2 e Dimensione del campione ed analisi statistica	p.46
4.3 Materiali e metodi coorte II	p.47
4.3 a Valutazione istologica	p.48
4.3 b FibroScan e controlled attenuation parameter	p.48
4.3 c Valutazione nutrizionale	p.49
4.3 d Valutazione dei TBARS	p.49
4.3 e Marcatori di peggioramento di malattia e disfunzione endoteliale	p.49
4.3 f Disegno sperimentale	p.50
4.3 g Analisi statistica	p.50
4.4 Materiali e metodi: subanalisi sui pazienti non-responder	p.51
4.4 a Pazienti	p.51
4.4 b Estrazione del DNA genomico da campioni Di sangue periferico	p.52
4.4 c Genotipizzazione PCR real time	p.52
4.4 d Disegno sperimentale	p.53
4.4 e Analisi statistica	p. 53
4.5 Risultati coorte I	p.54
4.5 a Studio clinico	p.54
4.5 b Studio in vitro: effetti del BPA su proliferazione e vitalità cellulare	p.60
4.5 c Studio in vitro: effetto del BPA sull'accumulo lipidico intracellulare	p.62
4.6 Risultati coorte II	p.64
4.7 Risultati subanalisi pazienti non responder	p.72
4.7 a Abitudini alimentari, esercizio fisico e confronto al Baseline tra i gruppi di studio	p.72

4.7 b Risultato terapeutico	p.75
4.8 Discussione	p.76
4.8 a Coorte I	p.76
4.8 b Coorte II	p.78
4.8 c Subanalisi pazienti non responder	p.80
Conclusioni	p.83
Capitolo V: Trained immunity e fegato	
5.1 Introduzione	p.85
5.2 Scopo dello studio	p.89
5.3 Metodologia	p.89
5.4 Risultati esperimenti pilota	p.90
5.5 Prospettive	p.91
Bibliografia	p.92

Capitolo I

La non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

1.1 Definizione

La NAFLD è una condizione patologica destinata nel prossimo futuro a rappresentare la malattia epatica cronica più comune nei paesi occidentali (1). Essa comprende un ampio spettro di quadri clinici aventi come comune base fisiopatologica l'accumulo di trigliceridi a livello epatico (steatosi), il quale, per essere definito patologico, deve superare il 5% del peso totale dell'organo (2). Requisito fondamentale per la definizione della NAFLD è che la steatosi si manifesti in soggetti con anamnesi negativa per eccessivo consumo giornaliero di alcolici. Non esiste una dose di alcol quotidiana considerata "sicura", quindi possiamo per lo più definire una dose giornaliera di alcol "a basso rischio" pari a non più di 2-3 Unità Alcoliche (36 grammi) per l'uomo e 1-2 Unità Alcoliche (24 grammi) per la donna. Queste dosi corrispondono a quelle contenute in un bicchiere (125 ml) di vino di media gradazione o in una lattina di birra (330 ml) di media gradazione o in una dose da bar (40 ml) di superalcolico. Condizione necessaria per diagnosticare la NAFLD è anche l'assenza di altre cause di danno epatico come infezioni virali, intossicazioni da farmaci o tossine, carenze nutrizionali o patologie metaboliche/genetiche (3-5). In questo contesto, è necessario differenziare una condizione di steatosi isolata non alcolica o non alcoholic fatty liver (NAFL), il cui rilievo istologico è il semplice accumulo di grasso intraepatico, dalla steatoepatite non alcolica o non alcoholic steatohepatitis (NASH), in cui l'esame istologico mostra, oltre alla steatosi, la degenerazione balloniforme (ballooning), l'infiltrato necro-infiammatorio e l'eventuale presenza di tessuto fibroso. La NASH, quindi, sulla base delle caratteristiche istologiche, presenta la tendenza alla progressione in stadi più avanzati di epatopatia come cirrosi, epatocarcinoma (HCC) e insufficienza epatica (1, 6).

1.2 Epidemiologia

La steatosi epatica può essere considerata una vera e propria epidemia nei Paesi occidentali, colpendo fino al 15-25% della popolazione generale (con valori oscillanti dal 20% al 40% negli Stati Uniti e dal 10% al 20% nei Paesi asiatici) (7) con notevole prevalenza anche nella popolazione giovanile: risulta, infatti, la più comune patologia epatica tra gli adolescenti del Nord America (8). In particolare, dagli studi di popolazione, la NAFLD appare la causa più frequente di alterazione degli enzimi di citonecrosi in soggetti adulti negli USA. Si calcola che sia attribuibile ad essa quasi il 90% dei casi di alterazioni asintomatiche delle aminotransferasi (9, 10). In Italia, una stima di prevalenza delle malattie epatiche croniche ha dimostrato come la percentuale di soggetti affetti da NAFLD sia in netto aumento, passando dal 10% al 18% a seconda dell'area geografica considerata ed ai diversi dati disponibili (1). La rilevanza epidemiologica della NAFLD è legata al fatto che essa è frequentemente associata a sovrappeso corporeo e/o ad obesità, condizioni in notevole aumento nei Paesi industrializzati, inclusa l'Italia. Se, infatti, si considera la fetta di popolazione che presenta i classici fattori di rischio per la NAFLD, come l'obesità o DM2, la percentuale di incidenza della NAFLD in tali soggetti, nella quinta/sesta decade di vita, arriva ad attestarsi rispettivamente a valori tra il 30 e 70% (11-14). La NAFLD è, quindi, in stretta correlazione con l'intolleranza glucidica, l'eccesso di massa grassa e tutta una serie di condizioni oggi riunite sotto il termine di Sindrome Metabolica (SM). La prevalenza della NAFLD è molto variabile nei vari gruppi etnici e tali differenze sono legate proprio alla diversa prevalenza della SM, essendo le due entità interconnesse da una comune base fisiopatologica.

1.3 Storia naturale

La storia naturale della NAFLD non è ancora del tutto nota, in parte perché con tale unico termine si indicano una serie di patologie con differente capacità evolutiva e in parte perché rappresenta una condizione clinica di recente interesse in campo scientifico. È stata considerata a lungo una condizione benigna e indolente, ma rappresenta, in una certa percentuale di casi, un fattore di rischio per patologie epatiche ed extraepatiche più gravi.

Essa, tuttavia, sembra essere una patologia a lenta progressione, in cui il principale fattore determinante l'evoluzione del processo è la severità istologica del danno epatico osservato alla prima diagnosi. Infatti, a differenza della NAFL, un quadro istologico che evidenzi la presenza di necrosi epatocitaria, di infiammazione e/o di fibrosi, si accompagna spesso ad una prognosi nettamente meno favorevole, avendo maggiore probabilità di progressione verso cirrosi e scompenso funzionale d'organo. Inoltre, va sottolineato che il rischio correlato alla NAFLD non è confinato al fegato, ma è stato dimostrato come, a differenza dei soggetti sani, quelli affetti da NAFLD presentino maggiore incidenza anche di DM2 (15-17) e di malattia cardiovascolare (18). Per quanto riguarda, invece, gli aspetti clinici, possono essere considerati importanti fattori di rischio di progressione verso la fibrosi l'età e l'insulino-resistenza con le patologie ad essa correlate, quali il DM2, l'obesità e l'ipertrigliceridemia.

1.4 Patogenesi e ruolo dei single nucleotide polymorphisms (SNPs)

I meccanismi fisiopatologici che conducono alla NAFLD non sono ad oggi completamente noti. Infatti, non è ancora stato del tutto chiarito il meccanismo responsabile dell'accumulo dei trigliceridi intraepatici e del conseguente danno agli epatociti. La presenza di NAFLD non è legata però ad un difetto intrinseco dell'epatocita, bensì ad un'incapacità del fegato di "smaltire" l'eccesso di trigliceridi prodotti sia per riesterificazione degli acidi grassi liberi (FFA) circolanti che per sintesi de novo. I lipidi delle membrane cellulari e degli organuli intracellulari, esposti all'ossigeno derivante dai processi metabolici e alla sua forma radicalica, altamente reattiva, perossidano, determinando così una modifica del quadro istologico epatico. Tutto ciò comporta, oltre ad un notevole consumo energetico, un'aumentata produzione di specie radicaliche e un esaurimento dei sistemi antiossidanti, entrambi responsabili di alterazioni intracellulari che determinano perdita di glutatione e di adenosina trifosfato (ATP), rilascio di citocromo C e attivazione delle caspasi. Una volta che, indipendentemente dalla causa, tale deposito di trigliceridi si instaura a livello epatico, esso può regredire parzialmente se vengono corretti gli aspetti

metabolici e nutrizionali che ne hanno determinato l'insorgenza. È altrettanto vero però che la possibile reversibilità spontanea, peraltro mai documentata, richiede tempo.

I trigliceridi intraepatici possono derivare da (19):

- un aumentato afflusso di FFA rilasciati maggiormente dal tessuto adiposo sotto l'effetto dell'insulino-resistenza;
- una ridotta ossidazione epatica degli acidi grassi da parte del mitocondrio e conseguente attivazione di vie metaboliche alternative;
- un'aumentata sintesi di trigliceridi per inutilizzo dei prodotti metabolici non completamente ossidati nel mitocondrio;
- un maggiore uptake di acidi grassi da parte dell'epatocita sotto l'effetto di aumentati livelli di glucosio e/o di insulina e di citochine proinfiammatorie, quale il Tumor Necrosis Factor (TNF)- α ;
- una diminuita sintesi o secrezione di very low-density lipoproteins (VLDL), entrambe condizioni che causano una ridotta escrezione di trigliceridi.

L'aumentato flusso di FFA al fegato è considerato il meccanismo principale, tra quelli studiati, di accumulo di trigliceridi. Esso può dipendere da un aumentato rilascio di FFA da parte degli adipociti o da una dieta ad elevato contenuto lipidico oppure da un incremento della sintesi endogena di FFA intraepatici (lipogenesi de novo). Quest'ultimo evento risulta particolarmente rilevante nella NAFLD: la sintesi ex novo di lipidi è responsabile dell'accumulo di almeno il 25% del totale dei trigliceridi epatici (20). Quando il tessuto adiposo supera la propria capacità di immagazzinare lipidi, il grasso si deposita in altri organi, specialmente nel fegato e nei muscoli, dove il metabolismo dei trigliceridi interferisce con il signalling intracellulare insulino-mediato, con il trasporto/fosforilazione del glucosio, con la sintesi di glucosio nel muscolo e la gluconeogenesi epatica, determinando una condizione di lipotossicità (21). Inoltre, il tessuto adiposo viscerale rilascia adipochine associate allo sviluppo della NASH (22) (figura 1).

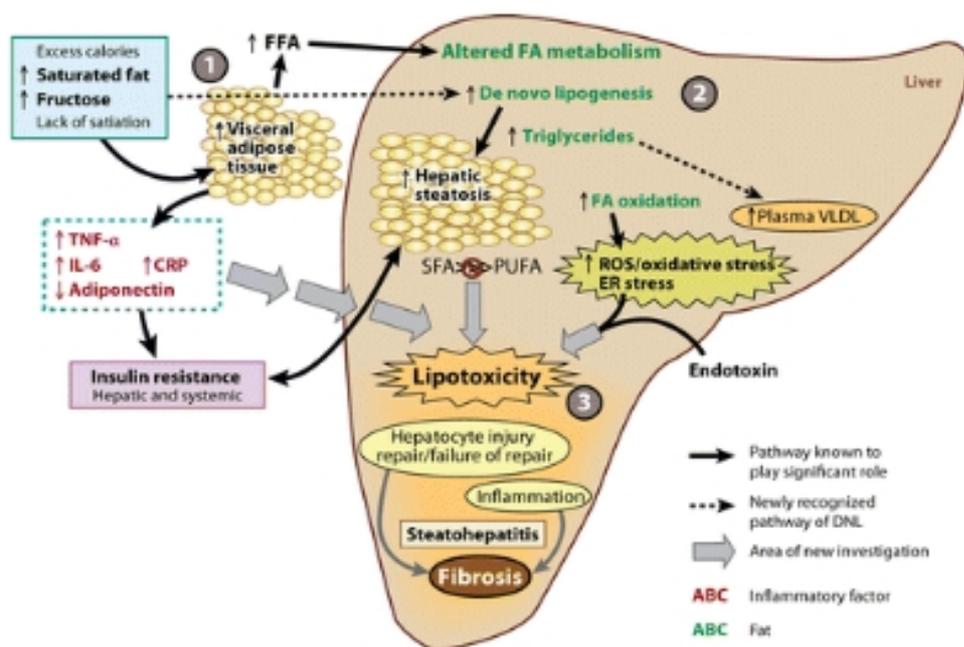
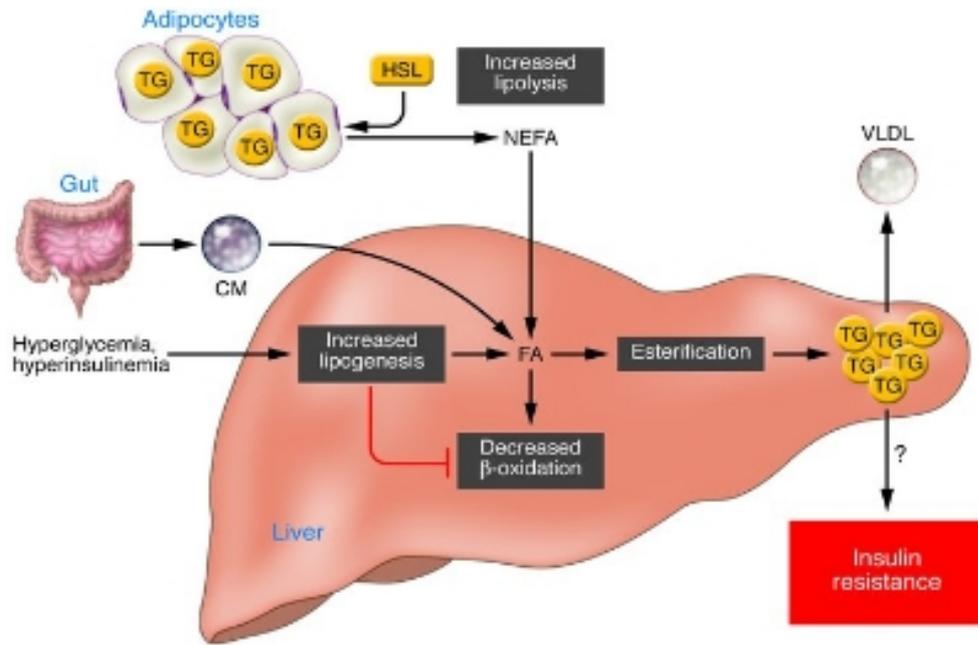


Figura 1. Fisiopatologia del danno.

La steatosi di per sé non è una condizione maligna, ma con essa entrano in gioco altri meccanismi patogenetici in grado di farla progredire in NASH. Buzzetti et al. hanno proposto un modello patogenetico, la “multiple hits hypothesis”, per spiegare la patogenesi della NAFLD (23): le abitudini alimentari e i fattori ambientali e genetici possono portare allo sviluppo di insulino-resistenza, obesità con proliferazione adipocitaria e cambiamenti nel microbioma intestinale. Gli studi di associazione genome wide (GWAS) hanno identificato il background genetico che sostiene la NAFLD, contando fino a quaranta diverse varianti genetiche che sembrano esercitare un ruolo cruciale in questo contesto fino all'insorgenza del carcinoma epatocellulare (HCC) (24, 25). I geni maggiormente studiati coinvolti in questo quadro clinico sono: patatin-like phospholipase domain-containing protein-3 (PNPLA3), the transmembrane 6 superfamily member 2 protein (TM6SF2) and membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 (MBOAT7) (26). I genotipi PNPLA3 rs738409 C>G (I148C/GG/G) e TM6SF2 rs58542926 (167E/KK/K) C>T sono associati a un maggiore accumulo di grasso nel fegato e al rischio di fibrosi, cirrosi e comparsa di HCC rispetto ai pazienti wild-type, sebbene le ragioni biologiche che circondano questo fenomeno non siano completamente comprese (27-29). Risultati simili derivano dallo studio della variante genetica MBOAT7 rs641738 (TMC4C/TT/T) C>T hanno dimostrato l'associazione tra quest'ultima ed il rischio di peggioramento della NAFLD in un'ampia coorte di soggetti a causa della sua influenza sul rimodellamento della catena acilica del fosfatidilinositolo epatico (30). Sicuramente, se da un lato l'identificazione di queste varianti genetiche ha fornito alla comunità scientifica importanti conoscenze sul quadro patogenetico della NAFLD, suggerendo anche il loro ruolo prognostico in questo contesto, dall'altro la mancanza relativi ad un potenziale effetto genetico sull'esito terapeutico rimane una domanda aperta, considerando che attualmente solo pochi studi clinici ben progettati sono stati pubblicati su questo argomento.

La resistenza all'insulina è uno dei fattori chiave dello sviluppo di NAFL/NASH e risulta in un aumento della lipogenesi de novo e in un'alterata inibizione della lipolisi tissutale con conseguente aumento del flusso di acidi grassi al fegato. La resistenza all'insulina favorisce, inoltre, anche una disfunzione della componente endocrina del tessuto adiposo con conseguente alterazione della

produzione e della secrezione di adipochine e citochine infiammatorie. L'accumulo intraepatico di trigliceridi si instaura in maniera contemporanea ad un'aumentata lipotossicità, data dagli alti livelli di acidi grassi e di colesterolo liberi. Di conseguenza, si assiste all'instaurarsi di meccanismi che portano a disfunzione mitocondriale e stress ossidativo con produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inoltre, la flora intestinale alterata porta ad un'ulteriore produzione di grassi acidi nell'intestino, dovuta anche ad aumento della permeabilità dell'intestino tenue, determinando incremento dell'assorbimento degli acidi grassi e aumento dei livelli circolanti di molecole che contribuiscono all'attivazione di un pathway infiammatorio con rilascio di citochine proinfiammatorie, come l'interleuchina (IL)-6 e il TNF- α . In soggetti predisposti da fattori genetici o sottoposti a modificazioni epigenetiche, tutti questi fattori influenzano il contenuto di grassi epatocitari e l'instaurarsi di un "ambiente infiammatorio" epatico cronico, attraverso eterogenei percorsi di danno epatocellulare con possibile progressione verso la morte epatocellulare (sia per tossicità diretta che per apoptosi) o verso l'attivazione delle cellule stellate epatiche e successivo deposito di matrice fibrosa. Negli epatociti sono presenti numerosi sistemi enzimatici e non (SOD, CAT, xantino-ossidasi, glutatione, vitamina E) capaci di contrastare l'aumentata produzione di specie radicaliche. Tuttavia, quando per la notevole e/o protratta produzione radicalica, le capacità di detossificazione si riducono, si verifica "stress ossidativo" con conseguente perossidazione delle membrane cellulari e aumento delle sostanze tossiche come la malondialdeide e il 4-idrossinonenale (HNE) (31). L'epatocita, in tali condizioni, va incontro a morte cellulare che può avvenire per necrosi o apoptosi. Avendo il TNF- α due recettori di membrana, si è ipotizzato che il polimorfismo per il recettore TNF- α 2 indirizzi verso uno dei due tipi di morte cellulare. Il TNF- α e l'IL-6 sono prodotti anche dal tessuto adiposo viscerale e sembrano contribuire alla genesi dell'insulino-resistenza e dell'obesità. Il TNF- α , infatti, agendo su enzimi come idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA)-reduttasi, la lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT), la lipoproteinlipasi e sulla I- κ B kinase (IKK)- β , con secondaria produzione del fattore di trascrizione nucleare κ B (NF- κ B), viene considerato uno dei principali responsabili dello sviluppo e del mantenimento di insulino-resistenza (32). Stress ossidativo, dieta ricca in grassi o difetti congeniti

a livello mitocondriale, sono tutti fattori capaci di attivare tale chinasi. Infatti, i pazienti con NAFLD presentano aumentati livelli circolanti di citochine in correlazione all'entità del danno epatico. La morte degli epatociti, l'aumentata produzione di citochine proinfiammatorie, i prodotti della perossidazione lipidica delle membrane, soprattutto il 4-HNE, sono tutti fattori capaci di innescare la sintesi di proteine della fase acuta, di richiamare neutrofili e di attivare ancor di più le cellule di Kupffer con conseguente ulteriore produzione di citochine. L'esito di questa lunga catena di eventi è la NASH. Infatti, le cellule di Kupffer attivate producono a loro volta aumentate quantità di Transforming Growth Factor (TGF)- β , il quale, associato all'aumento dei prodotti di perossidazione lipidica delle membrane, soprattutto il 4-HNE, induce l'attivazione delle cellule stellate (33). Esse si trasformano in miofibroblasti attivi e producono collagene. Anche le cellule endoteliali, stimulate da tali eventi, producono fattori di crescita quali il Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) e l'Insulin-like Growth Factor (IGF). Ne consegue, pertanto, la comparsa di fibrosi che, associata a neoangiogenesi e scompaginamento della struttura lobulare del fegato, conduce progressivamente a cirrosi (figura 2).

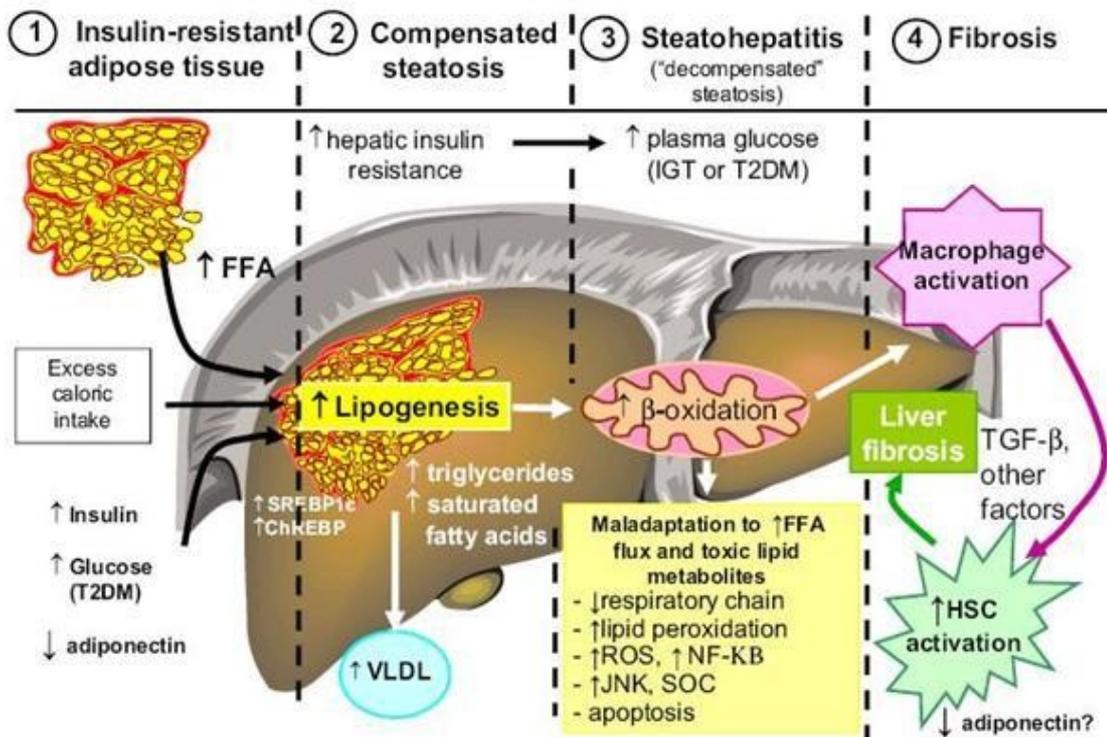


Figura 2. Progressione del danno epatico.

Inoltre, il sistema immunitario contribuisce alla patogenesi del danno, come documentato dalla presenza di anticorpi contro addotti proteine-citocromo CYP2E1, quest'ultimo notevolmente attivato in corso di condizione di fegato grasso. Sono stati anche evidenziati anticorpi verso lo stesso 4-HNE, derivante dalla perossidazione delle membrane.

Si ritiene che la steatoepatite possa migliorare in una bassa percentuale di casi (circa il 5%), ma che, seppur lentamente e in modo asintomatico, essa decorre negli anni verso la cirrosi. Sono ritenuti fattori predittivi di evoluzione verso la NASH e di conseguenza verso la cirrosi e le sue complicanze:

- età > 45 anni;
- sesso maschile;
- obesità;
- DM2;
- aspartato aminotransferasi (AST)/alanina aminotransferasi (ALT) > 1;

- ALT > 2 volte i valori normali;
- trigliceridemia > 150 mg/dl;
- alta ferritinemia.

1.5 NAFLD e sindrome metabolica

Data la sempre maggiore rilevanza clinica ed epidemiologica della NAFLD, l'interesse scientifico nell'ultimo decennio si è focalizzato sul riconoscere i principali meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo e della progressione della malattia, andando soprattutto ad evidenziare lo stretto legame esistente fra tale patologia e la SM. Infatti, la NAFLD è fortemente associata a tutte le componenti di questa complessa sindrome, ossia l'insulino-resistenza, l'obesità viscerale, l'intolleranza glucidica, la dislipidemia aterogena e l'ipertensione arteriosa. Proprio in virtù di questi legami, la NAFLD rappresenta, in molti casi, una delle componenti della SM, tanto da esserne addirittura considerata come la sua manifestazione epatica (34). Si definisce SM uno stato di minima infiammazione cronica, causata da un insieme di alterazioni metaboliche (obesità addominale, intolleranza glucidica, ipertensione arteriosa e dislipidemia), che si associa ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari e DM2.

I criteri da usare per la definizione di sindrome metabolica si basano sulla presenza di obesità centrale (circonferenza addominale ≥ 102 cm per il sesso maschile e ≥ 88 cm per il sesso femminile) insieme ad almeno due dei seguenti elementi:

- ipertrigliceridemia: ≥ 150 mg/dl oppure terapia in corso per tale dislipidemia;
- riduzione del colesterolo HDL: < 40 mg/dl per gli uomini e < 50 mg/dl per le donne oppure terapia in corso per tale dislipidemia;
- ipertensione arteriosa: pressione arteriosa sistolica (PAS) ≥ 130 mmHg e pressione arteriosa diastolica (PAD) ≥ 85 mmHg o trattamento ipotensivo in atto;
- glicemia a digiuno ≥ 110 mg/dl o precedente diagnosi di diabete mellito di tipo 2.

La International Diabetes Federation (IDF) ha stimato che circa un quarto della popolazione adulta mondiale sia affetta dalla sindrome metabolica (35). Un background genetico predisponente,

un'anamnesi positiva per tabagismo, una storia familiare di diabete, uno status socioeconomico elevato, una vita sedentaria e un elevato Body Mass Index (BMI) sono importanti fattori di rischio. La prevalenza di questa sindrome, basandosi sui criteri NCEP-ATP III del 2001, variava dall'8% al 43% negli uomini e dal 7% al 56% nelle donne in tutto il mondo (35). La presenza della sindrome metabolica è il più alto fattore predittivo dello sviluppo della NAFLD in un soggetto, sia nel sesso maschile che in quello femminile (36). I dati osservazionali, infatti, evidenziano chiaramente che la NAFLD presenta la sua maggiore prevalenza nei pazienti con insulino-resistenza, obesità, diabete mellito tipo 2 ed iperlipidemia e che questi correlano strettamente con l'epatopatia non-alcol relata (9). La presenza clinica di steatosi può essere evidenziata in più del 75% degli obesi e in circa il 90% dei soggetti affetti da obesità patologica. La NAFLD colpisce circa il 50% dei pazienti diabetici e sembra che l'associazione tra obesità e diabete mellito 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 ed il 19% era già evoluto in cirrosi (37). Dal punto di vista patogenetico, numerosi studi scientifici riconoscono come evento fondamentale alla base della NAFLD la presenza di insulino-resistenza e la conseguente iperinsulinemia (38-40). In particolare si pensa che l'insulino-resistenza, innescata principalmente dall'obesità, possa essere il comune denominatore per lo sviluppo sia della Sindrome Metabolica che della steatosi epatica, giustificandone la frequente coesistenza nello stesso soggetto. Tuttavia, ad oggi rimane ancora non chiaro se l'insulino-resistenza sia una causa della steatosi o piuttosto una sua conseguenza (41-44).

1.6 NAFLD, insulino-resistenza e obesità

L'insulina è un ormone prodotto dalle cellule β delle isole di Langerhans pancreatiche, secreto poi nella circolazione portale in risposta alla concentrazione plasmatica di glucosio. Insieme al muscolo scheletrico e al tessuto adiposo, il fegato è uno dei siti di azione principale di questo ormone: l'azione di quest'ultimo sul fegato si esplica durante il digiuno, promuovendo la glicogenosintesi post-prandiale di modo tale da mantenere costante i livelli di glucosio.

Dal punto di vista patogenetico numerose evidenze indicano che un evento di fondamentale importanza alla base della patogenesi della NAFLD è rappresentato dall'insulino-resistenza (12, 14). Il termine insulino-resistenza descrive uno stato di disregolazione dell'omeostasi glucosio-insulina, caratterizzata da una ridotta capacità dell'insulina nello stimolare le sue stesse azioni a livello epatico, muscolare e del tessuto adiposo. L'insulino-resistenza è uno dei fattori fondamentali nell'induzione di modificazioni nel metabolismo lipidico, quali un aumento della lipolisi periferica, un'aumentata sintesi di trigliceridi e un'aumentata captazione di acidi grassi da parte del fegato, condizioni queste che contribuiscono all'accumulo di trigliceridi nell'epatocita. Normalmente, gli acidi grassi vengono esterificati a livello epatico in trigliceridi e in seguito alcuni di questi vengono trasportati fuori dagli epatociti come very low-density lipoproteins (VLDL). L'insulino-resistenza (stimolata sia da citochine come il TNF- α sia da ormoni come la leptina che dagli stessi acidi grassi) porta ad un accumulo di grasso nel fegato dovuto principalmente all'instaurarsi di una condizione di iperinsulinemia. Più in dettaglio, l'iperinsulinemia conduce ad un accumulo intraepatico di grassi in diversi modi:

- induce a livello epatico un aumento della glicolisi con conseguente shift dei carboidrati verso la via lipogenetica;
- attiva la lipolisi a livello del tessuto adiposo;
- inibisce l'esterificazione degli FFA, evento che determina un'aumentata concentrazione sierica di questi ultimi che vengono captati dal fegato e utilizzati per la sintesi di trigliceridi;
- inibisce l'ossidazione degli FFA e lo smaltimento dei trigliceridi sotto forma di VLDL; infatti nonostante la secrezione di queste ultime sia aumentata a causa dell'eccessivo accumulo di grassi, la mancata ossidazione degli FFA e soprattutto la ridotta produzione di apolipoproteina B100 (apoB), una dei costituenti principali delle VLDL, diminuisce la capacità complessiva del fegato di esportare trigliceridi.

Il tessuto adiposo è quindi uno dei protagonisti nello sviluppo della sindrome metabolica in quanto è tra i principali responsabili della genesi e del mantenimento dell'insulino-resistenza.

Il fisiologico ruolo del tessuto adiposo è quello di garantire che la maggior parte degli FFA vengano captati dagli adipociti, di modo tale da prevenire un'eccessiva esposizione ad essi da parte di altri tessuti insulino-sensibili come il fegato e il muscolo scheletrico. Nel soggetto obeso, questo fine meccanismo di regolazione del deposito degli acidi grassi viene meno e questo va ad alterare il metabolismo lipidico, che diventa incapace di adattarsi alle fluttuazioni dello stato nutrizionale. Ciò è dovuto al fatto che un eccesso di nutrienti causa ipertrofia e iperplasia degli adipociti che possono andare incontro ad ipossia, causata dall'incapacità del circolo di sostenere le richieste metaboliche del tessuto adiposo (45). Proprio l'ipossia è stata proposta come il punto di partenza della necrosi e dell'infiltrazione macrofagica nel tessuto adiposo che, di conseguenza, porta ad una sovrapproduzione di molecole biologicamente attive note come adipochine, tra cui mediatori pro-infiammatori come TNF- α e IL-6, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) e la proteina C-reattiva (45). Queste molecole sono fondamentali nella regolazione della sensibilità insulinica, dello stress ossidativo, della risposta infiammatoria e della coagulazione del sangue. Quindi, le citochine proinfiammatorie e, in particolare, il TNF- α , possono giocare un ruolo nell'indurre insulino-resistenza, ma, d'altra parte, l'obesità e l'insulino-resistenza possono attivare la produzione di tali citochine determinando un circolo vizioso che automantiene il danno.

1.7 NAFLD e diabete mellito di tipo II

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, il diabete mellito comprende un gruppo di disordini metabolici a diversa eziologia che influenzano il metabolismo glucidico, lipidico e proteico ed è una condizione caratterizzata da iperglicemia cronica per difetto nella secrezione o nell'azione dell'insulina, presenti in differente grado. L'insulina consente l'ingresso del glucosio nelle cellule e il suo conseguente utilizzo come fonte energetica. Quando questo meccanismo è alterato, il glucosio si accumula nel circolo sanguigno, determinando iperglicemia. Il DM2 è la forma più comune di diabete, rappresentando circa il 90% dei casi di questa malattia. Generalmente, la malattia si manifesta dopo i 30-40 anni e sono ormai conosciuti numerosi fattori di rischio associati alla sua insorgenza tra i quali: la familiarità per diabete, lo scarso esercizio

fisico, il sovrappeso e l'appartenenza ad alcune etnie. Riguardo la familiarità, circa il 40% dei diabetici di tipo 2 ha parenti di primo grado (genitori, fratelli) affetti dalla stessa malattia. Il diabete mellito di tipo 2 è una patologia ad eziologia complessa che risente di influenze genetiche ed ambientali. Sebbene i geni responsabili di questo disordine non siano ancora stati identificati, è noto che la malattia sia poligenica e multifattoriale. La concordanza del diabete mellito tipo 2 nei gemelli monozigoti si colloca tra il 70% e il 90%. I soggetti con anamnesi familiare positiva per questa patologia hanno un rischio di ammalarsi di diabete da due a quattro volte superiore rispetto alla popolazione generale; se un genitore è diabetico di tipo 2, il rischio nei figli raggiunge il 38%, mentre se sono affetti entrambi i genitori, la prevalenza è di circa il 60% a 60 anni. Sono numerosi i loci genici che contribuiscono alla suscettibilità e, in aggiunta ad essi, i fattori ambientali, come dieta ed attività fisica, ne modulano l'espressione fenotipica. Le anomalie fisiopatologiche che fanno da fattore chiave e caratterizzano questa malattia sono tre:

- insulino-resistenza periferica;
- alterata secrezione insulinica;
- eccessiva produzione epatica di glucosio.

L'aspetto principale del diabete tipo 2 è rappresentato dalla ridotta capacità dell'insulina di agire efficacemente sui tessuti bersaglio periferici (muscoli e fegato). La resistenza all'azione insulinica altera l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti insulino-sensibili e aumenta la produzione epatica di glucosio: entrambi gli effetti contribuiscono all'iperglicemia che si riscontra nel diabete. L'aumentato rilascio epatico di glucosio è responsabile dell'aumento dei livelli di glicemia a digiuno, mentre il ridotto utilizzo periferico di glucosio determina iperglicemia post-prandiale. Si ritiene che la causa principale dell'insulino-resistenza vada ricercata nei difetti di molecole implicate nei meccanismi postrecettoriali (46). Un'altra teoria prevede invece che gli elevati livelli di acidi grassi liberi, come accade nell'obesità, possano contribuire alla patogenesi del diabete mellito tipo 2 in diversi modi: alterando l'utilizzo del glucosio nel muscolo scheletrico, promuovendo la produzione epatica di glucosio e alterando le funzioni della cellula β (47). Nel diabete la secrezione insulinica è inizialmente aumentata, in risposta alla resistenza insulinica, per

conservare la normale tolleranza glucidica. Successivamente, il difetto della secrezione insulinica progredisce fino ad una secrezione insulinica inadeguata. Le cause del declino delle capacità secretive non sono note. Sono stati chiamati in causa diversi meccanismi che possono alterare la funzione insulare: depositi di fibrille amiloidi a livello delle insule (48), tossicità glucidica (49) e lipotossicità (50). Il fegato mantiene la normoglicemia durante il digiuno attraverso la glicogenolisi e la gluconeogenesi, usando substrati derivanti dal muscolo scheletrico e dal tessuto adiposo. L'insulina promuove l'accumulo di glucosio come glicogeno epatico e sopprime la gluconeogenesi. In questa patologia, l'insulino-resistenza epatica origina dall'inefficacia dell'iperinsulinemia nel sopprimere la gluconeogenesi. Ciò provoca iperglicemia a digiuno e ridotto accumulo di glicogeno da parte del fegato nella fase post-prandiale (51). L'aumento della produzione epatica di glucosio avviene precocemente, anche se probabilmente insorge dopo l'instaurarsi di anomalie della secrezione insulinica e di insulino-resistenza nel muscolo periferico. Da ciò appare chiaro che il diabete e la NAFLD condividano alcuni meccanismi patogenetici alla base del loro sviluppo. Per quanto riguarda l'associazione con la NAFLD, la prevalenza di questa in soggetti diabetici è stata stimata essere all'incirca del 70%; inoltre la presenza di un diabete mellito tipo 2 sembra particolarmente associata allo sviluppo di fibrosi e NASH: Angulo et al. nel loro studio hanno dimostrato come il 66% dei soggetti NAFLD che mostrava di avere fibrosi avanzata, associava a questa anche il diabete e l'obesità (52). Descrivere la patogenesi della NAFLD in soggetti diabetici è complesso ed i fattori implicati non sono ancora stati esplorati pienamente, ma sicuramente l'alterazione del metabolismo lipidico, la disregolazione glicemica causata dall'insulino-resistenza, che porta a un iperinsulinismo prima e a un deficit insulinico poi, l'aumentato stress ossidativo e lo stato proinfiammatorio sistemico sono meccanismi coinvolti. Non bisogna inoltre dimenticare l'influenza della genetica e delle condizioni ambientali, sicuramente entrambi implicati nell'influenzare la stretta relazione tra NAFLD e diabete (53, 54).

Capitolo II

Gli interferenti endocrini nelle malattie metaboliche: patologia molecolare

2.1 Definizione ed interesse biologico degli interferenti endocrini

Gli interferenti endocrini (IE) o come gli autori anglosassoni li identificano Endocrine: Disrupting Chemicals (EDC), rappresentano un eterogeneo gruppo di contaminanti chimici che è possibile ritrovare dispersi nell'ambiente o concentrati negli alimenti.

Sono caratterizzati dalla potenziale capacità di interferire, attraverso svariati meccanismi, con il funzionamento del sistema endocrino, in special modo sull'attività biologica degli ormoni sessuali e degli ormoni tiroidei (55). La definizione classica dell'Environmental Protection Agency (EPA 1997) è: *"un IE è una sostanza esogena che provoca effetti avversi sulla salute di un organismo intatto, o la sua progenie, secondaria ai cambiamenti nella funzione endocrina"*. Tale definizione è stata in seguito adottata dall'Unione Europea, integrata da valutazioni di diverse agenzie internazionali, che indicano gli IE come un ampio, eterogeneo e tuttora incompletamente conosciuto gruppo di sostanze che spazia da contaminanti ambientali persistenti a composti utilizzati come fitosanitari, antiparassitari, composti utilizzati in prodotti industriali e di consumo ed infine composti naturali come i fitoestrogeni.

L'interesse biologico nei confronti degli IE è motivato da:

- l'eterogeneità dei composti classificati in tale categoria di sostanze, da cui consegue sia la capacità di alterare svariati meccanismi del complesso sistema endocrino sia la molteplicità delle possibili vie di esposizione;
- la capacità di colpire numerosi organi e sistemi, principalmente il sistema riproduttivo e la tiroide, ma anche il sistema nervoso, immunitario e metabolico;
- i dati sperimentali che indicano l'importanza di aspetti insufficientemente compresi, quali il rischio di effetti additivi o sinergici e/o la possibilità di effetti a dosi molto basse in fasi vulnerabili del ciclo vitale, in particolare per i composti che interagiscono con recettori nucleari;
- il numero crescente di studi che mostrano associazioni fra l'esposizione a EDC con effetti avversi nelle popolazioni animali e nell'essere umano;

- l'importanza delle patologie cronico-degenerative su base endocrina;
- la diffusa esposizione, la cui sorveglianza è resa maggiormente complessa dalla capacità di persistenza e bioaccumulo di diversi gruppi di composti
- la presenza di suscettibilità variabili nelle popolazioni esposte.

2.2 Classificazione degli IE

In generale gli IE si possono classificare nelle seguenti categorie principali:

1. farmaci o estrogeni sintetici come il dietilstilbestrolo (DES);
2. fitoestrogeni tra cui: isoflanoidi, cumestani, lignani, stilbeni;
3. pesticidi distinguibili in: organofosforici, carbammati, ditiocarbammati, organoclorurati, erbicidi del gruppo ammonio quaternario;
4. plastificanti (in particolare ftalati) e prodotti derivati dalla combustione del policloruro di vinile (PVC);
5. sostanze di origine industriale come: fenoli, tra cui il bisfenolo A (BPA), ritardanti di fiamma, acido perfluorooctanico e i suoi sali;
6. metalli pesanti come piombo, cadmio, mercurio.

Gli IE hanno caratteristiche lipofile che permettono loro di diffondere attraverso la membrana cellulare, di legarsi ai recettori per gli ormoni steroidei e accumularsi nel tessuto adiposo (56). La caratteristica lipofila, tuttavia, rende la solubilità degli IE molto difficile in matrici acquose, ciò significa che gli effetti dannosi di questi composti dipendono dal loro bioaccumulo nel tempo. Il bioaccumulo delle sostanze tossiche può avvenire direttamente dall'ambiente in cui l'organismo vive (bioconcentrazione), ove le concentrazioni della sostanza nei tessuti dell'organismo diventano progressivamente più alte di quelle presenti nell'ambiente da cui è stata assorbita, o attraverso l'ingestione lungo le catene trofiche (biomagnificazione). L'uomo essendo al vertice della catena trofica risulta esposto alle conseguenze derivanti dalla presenza di EDC nell'ambiente anche a basse concentrazioni.

2.3 Il bisfenolo A

Una delle sostanze classificate interferente endocrino è il 2,2-bis (4-idrossifenil) propano (CAS 80-05-7) conosciuto come BPA, un composto organico con due gruppi fenolo (figura 3).

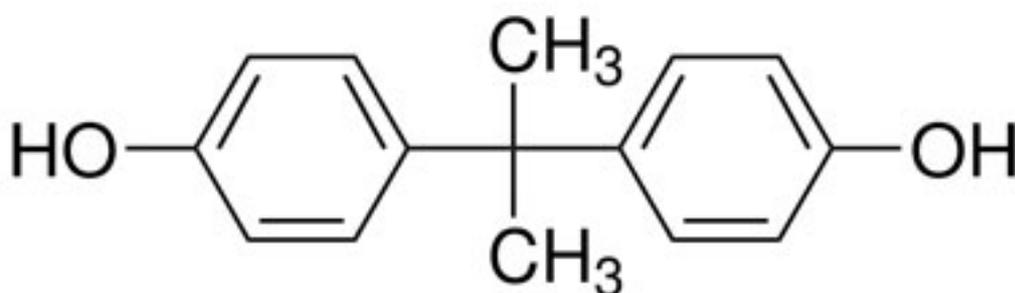


Figura 3: Struttura chimica del 2,2-bis (4-idrossifenil)propano, bisfenolo A, BPA

Il BPA è stato sintetizzato per la prima volta nel 1891 e a partire dal 1930 è stato testato per un potenziale uso farmaceutico come estrogeno sintetico (57, 58). Sebbene abbia mostrato di possedere una certa attività estrogenica, non è stato utilizzato a scopi farmaceutici in quanto il dietilstilbestrolo (DES), un composto sintetico strutturalmente simile al BPA, mostrava un'attività estrogenica molto più elevata. A partire dagli anni 50 si è assistito ad un utilizzo massivo del BPA da parte delle industrie produttrici di plastiche. Esso è infatti un monomero chiave nella produzione delle resine epossidiche e delle più comuni forme di policarbonato. Il policarbonato, sostanza pressoché perenne, è usato per un gran numero di prodotti per bambini (es. biberon), stoviglie, contenitori di plastica per microonde, bottiglie per bibite, attrezzature sportive, lenti per gli occhiali, elettrodomestici, caschi di protezione, otturazioni dentarie ed ovunque siano necessarie

caratteristiche di durezza e resistenza. Le resine epossidiche che contengono BPA sono invece utilizzate come rivestimento interno nella maggior parte delle lattine e scatolette per alimenti e bevande o come rivestimento per i coperchi in metallo di barattoli e bottiglie di vetro (ad esempio per gli omogeneizzati e i succhi di frutta). Il BPA è inoltre impiegato in una varietà di altre applicazioni: vernici a base di resine epossidiche, stucco per legno, ritardanti di fiamma, adesivi, materiali da costruzione, componenti elettronici, rivestimenti di carta (59), fabbricazione di pneumatici e fluido dei freni, resine e sigillanti dentali (60), rivestimenti di cd e dvd e inchiostri per stampanti. È inoltre presente in almeno 15 tipologie di prodotti cartacei, tra cui volantini, riviste e giornali, tovaglioli e fazzoletti di carta, carta igienica, banconote, biglietti da visita, buste postali, carte d'imbarco aereo e carta termica, impiegata, ad esempio, nei registratori di cassa, nelle etichette per bagagli, nei biglietti del bus, del treno e della lotteria. Il BPA è diventato persistente nell'ambiente negli ultimi ottant'anni a causa della sua continua presenza e diffusione. Poiché la domanda dei prodotti contenenti BPA è aumentata, la sua distribuzione ambientale è cresciuta esponenzialmente. Nel 2003 a livello mondiale la produzione di BPA era di 3,2 milioni di tonnellate (61), circa un terzo dei quali è stato prodotto negli Stati Uniti. Il consumo globale di BPA nell'anno 2011 è stato superiore a 5.5 milioni di tonnellate, mentre oltre 100 tonnellate vengono rilasciate ogni anno nell'atmosfera (62).

Una prima indicazione della potenziale distribuzione di BPA in ambiente può essere ottenuta dalle sue proprietà fisico-chimiche. Il BPA viene preparato tramite la condensazione dell'acetone (da cui il suffisso A nel nome) con due equivalenti di fenolo. La reazione è catalizzata da un acido, come l'acido cloridrico (HCl) o da una resina sulfonata di polistirene. Il composto risultante a temperatura ambiente ha una pressione di vapore bassa, alto punto di fusione e solubilità moderata, ed è pertanto improbabile che il BPA rilasciato in ambiente acquatico si volatilizzi. Si ritiene che meno dell'1% del BPA in ambiente si volatilizzi nell'atmosfera, dove subisce una rapida degradazione per foto-ossidazione. Il contenuto di BPA in atmosfera infatti è sensibilmente inferiore rispetto a quello rilevabile nell'acqua e nel suolo. Questo dipende dalla scarsa volatilità e dalla breve emivita. Il potenziale di trasporto in aria è notevolmente inferiore (<0.0001%) a quelli

misurabili in acqua (~30%) e nel suolo 26 (~68%) (59). Il BPA presente nel particolato ambientale è degradato con ogni probabilità da radicali idrossilici e l'emivita di reazione è stimata in 4.8 ore. La fotodegradazione del BPA in aria, avviene con una emivita compresa tra 0.7 e 7.4 ore. Il tempo di dimezzamento in acqua va da circa 66 ore a 160 giorni e risulta inoltre essere più persistente in acque marine che fluviali in quanto non viene degradato dai microrganismi aerobici presenti nei fiumi. Per questo motivo i prodotti ittici marini presentano un più alto livello di BPA rispetto a quelli fluviali. Il BPA contenuto nel suolo è legato alla densità di popolazione come conseguenza di rifiuti contaminati. L'emivita di degradazione nel suolo è di circa 30 giorni.

Anche se si degrada rapidamente esso è persistente nell'ambiente a causa di emissione continua (63). Il BPA può essere rilasciato direttamente o indirettamente nell'ambiente a qualsiasi livello del ciclo di vita di un prodotto: produzione, consumo, smaltimento. Nella fase produttiva si hanno emissioni accidentali durante il trattamento e la lavorazione dei monomeri plastici (64). I rilasci durante il consumo, per quanto riguarda gli alimenti, sono dovuti ad una piccola frazione di BPA che viene ingerito poiché migra nel tempo dal contenitore al contenuto (es. bevanda in lattina o contenitore per microonde). I principali fattori che influenzano il passaggio del BPA negli alimenti sono la durata e la temperatura di riscaldamento durante la fase di inscatolamento. Anche il contatto con composti acidi o basici, la presenza di elevati livelli di cloruro di sodio o di oli vegetali, è in grado di provocare un incremento del rilascio di BPA dai materiali polimerici. Numerosi studi hanno evidenziato che il BPA viene rilasciato dai biberon in policarbonato (62), che in molti Paesi sono stati ritirati dal commercio nel 2011 e da bottiglie di acqua riutilizzabili (65). Inoltre, altri studi hanno documentato la lisciviazione del BPA dalle resine usate per il rivestimento di contenitori utilizzati per la conservazione di cibo, acqua e alimenti per lattanti in scatola (62). L'esposizione al BPA non avviene solo per via alimentare. Molti prodotti non alimentari possono rilasciare BPA che a sua volta viene assorbito per inalazione o per contatto: un esempio è quello della carta termica degli scontrini e delle fotocopie ne rilascia una discreta quantità attraverso il contatto con l'epidermide (66, 67). I rilasci post-consumo sono principalmente dovuti agli scarichi di impianti di depurazione delle acque reflue municipali, alla

lisciviazione dalle discariche, alla combustione di rifiuti domestici e alla degradazione di materie plastiche (68, 69).

2.4 Meccanismi di azione biologica del BPA

Come già accennato in precedenza, l'esposizione cronica a bassi livelli di BPA influisce significativamente sui sistemi biologici attraverso l'interruzione dell'omeostasi ormonale e della segnalazione cellulare (70) (figura 4).

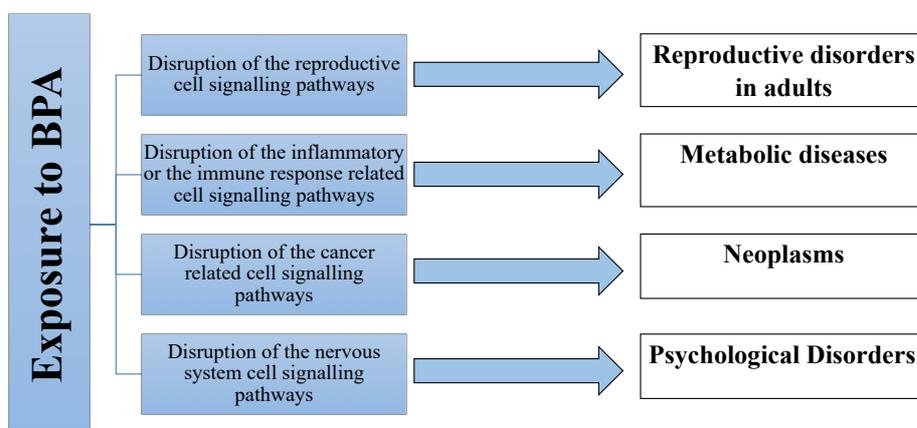


Figura 4. Principali vie di esposizione al bisfenolo A e patologie associate.

Dallio et al. IJERPH 2019

Poiché diversi studi hanno suggerito che livelli elevati (sierici o urinari) di BPA potrebbero essere associati a obesità, IR e sindrome metabolica e tutte queste condizioni sono state anche correlate a risposte infiammatorie sistemiche, sembra scientificamente promettente concentrarsi sul ruolo emergente dell'esposizione al BPA nelle alterazioni delle vie metaboliche di segnalazione cellulare ed endocrine al fine di spiegare il legame patogenetico tra inquinamento ambientale e sviluppo di malattie epatiche metaboliche croniche (71, 72). Il BPA probabilmente agisce in modo indiretto, legando i recettori nucleari e di membrana come il recettore degli estrogeni α/β ($ER\alpha/\beta$), il recettore degli androgeni (AR), il recettore degli estrogeni accoppiato con proteine G (GPER), noto anche come recettore accoppiato con proteine G 30 (GPR30), recettore del fattore di crescita-

1 insulino-simile (IGF-1R) e del recettore correlato agli estrogeni-gamma (ERR γ), riducendo la risposta biologica correlata alla loro attivazione da parte dei loro ligandi fisiologici. Tuttavia, questo composto potrebbe anche sfruttare i suoi effetti direttamente attraverso una stimolazione mediata da BPA di questi recettori (73-76). Per quanto riguarda GPR30, la sua attivazione induce le vie ERK/protein-chinasi attivate dal mitogeno (MAPK) e fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K)/AKT attraverso un "meccanismo non genomico" (77). Inoltre GPR-30 è in grado di transattivare il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). Questo recettore può quindi attivare la via MAPK o PI3K / AKT. Questa interazione può causare l'attivazione di percorsi MAPK e PI3K nelle cellule immunitarie, migliorando la produzione dei mediatori proinfiammatori, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), l'interleuchina (IL) -1 e IL-6 che sono alcuni dei mediatori infiammatori più importanti che sostengono il processo di infiammazione sistemica legata alla sindrome metabolica (70). Come noto, l'infiammazione sistemica determina un chiaro peggioramento della IR e quindi migliora il legame patogenetico con le malattie metaboliche, generando un circolo vizioso in grado di peggiorare l'omeostasi metabolica (figura 5).

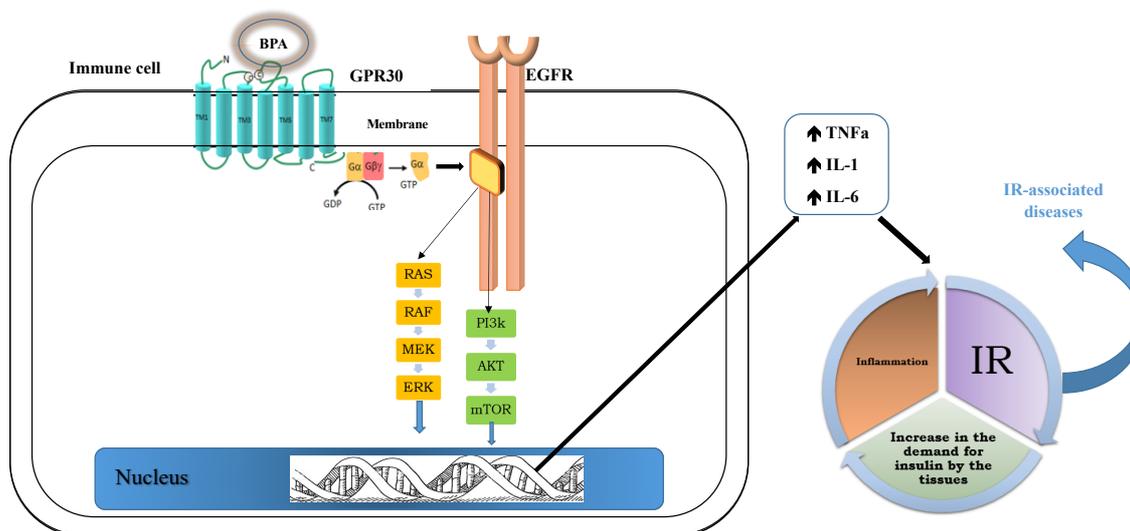


Figura 5. Attivazione del recettore 30 (GPR30) accoppiato con proteina G mediata da BPA ed effetti relativi. BPA attiva GPR30.

Nelle cellule immunitarie, l'attivazione mediata da GPR 30 delle vie MAPK e PI3K (attraverso la transattivazione dell'EGFR) induce la produzione di citochine infiammatorie. A sua volta l'infiammazione peggiora l'IR, portando ad un aumento della domanda di insulina da parte dei tessuti. Questo determina un conseguente aumento dell'infiammazione con implicazioni negative sulla sensibilità periferica all'insulina, innescando così un circolo vizioso.

BPA, bisfenolo A; GPR30, recettore accoppiato con proteine G 30; EGFR, recettore del fattore di crescita epidermico; ERK, chinasi extracellulare regolata dal segnale; RAS, sarcoma di ratto; RAF, proto-oncogene serina / treonina-proteina chinasi; PI3K, fosfatidilinositol-3 chinasi; Akt, apoptosi che inibisce la chinasi; mTOR, bersaglio di rapamicina nei mammiferi; TNF- α , fattore di necrosi tumorale; IL-1, interleuchina 1; IL-6 Interleuchina-6; IR, insulino-resistenza.

Dallio et al. IJERPH 2019

Soriano et al. ha dimostrato che i topi esposti a 1 nM di BPA hanno sviluppato diabete con un meccanismo peculiare che coinvolge l'attivazione mediata da BPA di ER e l'alterata funzione dei canali K-ATP che porta alla disregolazione del rilascio di insulina da parte delle cellule del pancreas (78). Inoltre Kang et al. hanno utilizzato un modello murino di diabete che coinvolge l'insufficienza insulinica indotta dalla streptozocina, in cui l'esposizione al BPA, attraverso l'espressione di ER α pancreatico e citochine correlate all'infiammazione (inclusi TNF- α e IL-1), ha aumentato i livelli sierici di insulina determinando un peggioramento dell'IR (79). Tuttavia, più recentemente, BPA ha dimostrato di essere in grado di agire come composto mimetico E2 (17 β -estradiolo) in presenza di ER α , legando il recettore ER α , portando ad un aumento dell'espressione dei trasportatori di glucosio (GLUT)-4 e anche nell'assorbimento del glucosio (77). Anche se quest'ultimo effetto sembra paradossale e in contraddizione con una condizione di IR, potrebbe essere giustificato dal fatto che l'aumento dei livelli di glucosio intracellulare può indurre di conseguenza una proliferazione cellulare rapida (una prospettiva interessante in un contesto neoplastico). Le evidenze di cui sopra suggeriscono un ruolo predominante di BPA nei processi infiammatori. Tuttavia, soprattutto nella descrizione delle malattie metaboliche del fegato,

l'infiammazione non deve essere considerata come l'unica coinvolta. In questo setting devono essere valutati anche lo stress ossidativo strettamente correlato e la disfunzione mitocondriale. A questo proposito, una parte dei meccanismi di stress ossidativo indotti dal BPA è stata recentemente chiarita: mentre la maggior parte del BPA viene convertita in metaboliti meno tossici, il BPA libero rimanente induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso l'enzima (H₂O₂/perossidasi e reazioni NADPH/CYP450) e non enzimatiche (ONOO⁻/CO₂ e -OCl/HOCl) (40). Questi meccanismi contribuiscono a creare un microambiente ossidativo in cui le cellule del fegato possono essere direttamente o indirettamente danneggiate dalle difese cellulari indotte dai ROS (80) (figura 6).

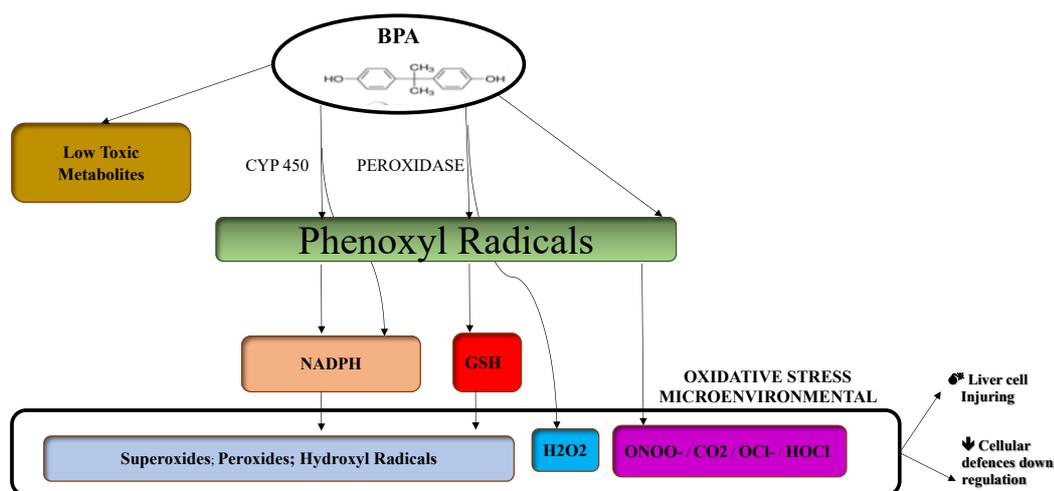


Figura 6. Meccanismi di stress ossidativo indotti da BPA.

Il BPA viene convertito (per la maggior parte) in metaboliti meno tossici; il BPA libero rimanente induce la formazione enzimatica (H₂O₂ / perossidasi e NADPH / CYP450) e non enzimatica (ONOO⁻ / CO₂ e -OCl / HOCl) di radicali fenossilici che interagiscono con NADPH o GSH intracellulare insieme a ulteriori processi enzimatici, producendo così una varietà di specie radicali, inclusi superossidi, perossidi e radicali idrossilici. In questo microambiente ossidativo, sono possibili lesioni alle cellule del fegato e riduzione delle difese

cellulari. BPA, bisfenolo A; CYP450, citocromo P450; GSH, Glutazione; H₂O₂, perossido di idrogeno; ONOO, perossinitrito; CO₂, anidride carbonica; Ione di ipoclorito; HOCl, acido ipocloroso.

Dallio et al. IJERPH 2019

L'esposizione al BPA sembra essere in grado di ridurre l'enzima antiossidante catalasi (CAT), interagendo con esso attraverso un legame idrofobo ed elettrostatico, inducendo un cambiamento strutturale e una perdita di funzione dell'enzima (81). Un recente studio sui ratti maschi ha provato come una somministrazione orale cronica di BPA a basse dosi potrebbe alterare l'omeostasi dello stress ossidativo (82). In questo modello animale, il BPA sembra aumentare i livelli di malondialdeide (MDA), un marker di perossidazione lipidica, nelle cellule epatiche e ridurre il glutazione (GSH), la principale difesa antiossidante degli epatociti (82). Inoltre, nello stesso modello animale, una somministrazione di BPA per 30 giorni alla dose di 25 mg/kg ha ridotto i livelli di attività di CAT e superossido dismutasi (SOD) (43). È interessante notare che gli autori hanno anche studiato i livelli epatici di miRNA (MiR) che regolano la produzione di diverse inteleuchine: pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1, IL-6) e anti-infiammatorie (IL-10) dimostrando un aumento del primo gruppo e una riduzione del secondo. Questa scoperta ha messo in evidenza, ancora una volta, il legame diretto tra l'induzione dello stress ossidativo e la generazione di un microambiente infiammatorio che rappresenta la chiave patogenetica per spiegare il peggioramento del NAFLD in questo contesto (83). Pertanto i disturbi metabolici associati all'esposizione al BPA (obesità, DM2, PCO, malattie del fegato metaboliche) sembrano essere caratterizzati da un comune denominatore patogenetico identificato nell'infiammazione indotta da BPA con IR e stress ossidativo. Tuttavia, oltre a questi meccanismi chiariti, sta emergendo un modo più complesso di BPA, che coinvolge il microbioma intestinale e vari sistemi di neurotrasmettitori. A questo proposito topi con esposizione prenatale di BPA hanno manifestato un alto rischio di obesità e disordini metabolici nella vita adulta a causa della disregolazione della risposta infiammatoria indotta da una modifica della flora batterica intestinale, che consisteva nel

decremento nella proporzione della popolazione di bifidobatteri e di firmicutes (84). Per quanto riguarda l'interferenza degli EDC sul sistema nervoso, un recente studio ha dimostrato la capacità di BPA di interferire con l'innervazione parasimpatica del fegato in un modello suino (85). Questa interruzione neurochimica modifica i livelli di neuropeptidi, come G-alanina e peptide simile alla g-alanina (GAL), la trascrizione regolata da cocaina e anfetamina (CART) e Peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), che svolgono un ruolo nel controllo a lungo termine della fame, conducendo così all'obesità infantile e allo sviluppo del diabete (85).

2.5 Metodologie analitiche per la determinazione del BPA

Diversi metodi sono stati sviluppati e utilizzati per valutare l'esposizione dell'uomo a questo contaminante. Nella scelta della tecnica analitica per la determinazione di BPA in campioni biologici è necessario innanzitutto considerare se è richiesta la determinazione di BPA totale, della forma tal quale oppure delle forme metaboliche urinarie (glucoronata e sulfonata). Alcuni ricercatori ritengono che la misurazione del BPA urinario possa essere sovrastimata rispetto alla sua concentrazione reale (86). Ciò sembra essere plausibile se la tecnica impiegata oltre al BPA identifica altre sostanze simili da un punto di vista molecolare oppure la sovrastima può risultare espressione di una scarsa o limitata specificità del metodo di saggio utilizzato.

In generale, l'analisi prevede due fasi:

1. purificazione (estrazione) del BPA dalle urine e concentrazione, mediante cromatografia d'affinità su estrazione in fase solida (SPE) o mediante estrazione liquido-liquido;
2. rilevazione e quantificazione di BPA mediante:
 - gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS);
 - cromatografia liquida ad elevate prestazioni con rilevamento a fluorescenza o elettrochimico;
 - cromatografia liquida ad elevate prestazioni interfacciata a spettrometria di massa (HPLC/MS o HPLC/MS-MS).

Tali tecniche strumentali sono sempre precedute da una separazione cromatografica che avviene grazie all'interazione tra una fase stazionaria (solida), posta all'interno di una colonna cromatografica e una fase mobile (liquida o gassosa) che fluisce attraverso essa. La GC/MS è generalmente impiegata per l'analisi di BPA in campioni ambientali. Questo tipo di metodica richiede un processo di derivatizzazione a causa della scarsa volatilità del composto e una fase preparativa complessa. Per la valutazione delle forme coniugate è necessario effettuare un cleavage enzimatico al fine di facilitare l'ottenimento dei rispettivi derivati volatili. In HPLC non è previsto il passaggio di derivatizzazione per cui la preparazione del campione risulta più semplice. Se paragonata alla GC l'efficienza di separazione è inferiore, ciò può portare a una difficoltà nella quantizzazione del composto in esame e alla necessità di usufruire di sistemi di rilevazione dotati di una maggiore selettività. La rilevazione a fluorescenza permette di migliorare sia la specificità, sia la sensibilità. La determinazione del BPA nel siero utilizzando questa tecnica ha permesso di ottenere un limite di rilevabilità (limit of detection, LOD) pari a $5\mu\text{g/L}$, mentre valutazioni in urina (87) hanno riportato LOD decisamente inferiori ($0.012\mu\text{g/L} - 0.34\mu\text{g/L}$). La Cromatografia Liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS) è caratterizzata da un'elevata selettività e sensibilità (soprattutto nella versione MS-MS). Tale tecnica strumentale accoppia l'utilizzo della cromatografia liquida (LC) a quello della spettrometria di massa (MS). La spettrometria di massa si basa sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica (m/z). Il principio su cui si basa consiste nella ionizzazione della molecola in esame, attraverso l'espulsione di un elettrone. Il catione radicalico che ne deriva (ione molecolare) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (non rilevati dallo strumento), in parte generando cationi e/o radicali cationi (ioni frammento). L'ione molecolare ed i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) sono quindi discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector. L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella ionizzazione di molecole in fase gassosa, nella separazione dei diversi ioni prodotti e nella loro rivelazione. Il risultato di questo processo è lo spettro di massa che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro

rapporto massa/carica. Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari, sia nominali che esatte e di ottenere dei profili di frammentazione specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale. Si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità. La ionizzazione primaria del campione viene realizzata in un'apposita camera di ionizzazione in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una sorgente ionica, un componente del sistema che varia a seconda della tecnica utilizzata. Nel nostro caso è stato utilizzato uno spettrometro dotato di sorgente Turbo-ion electrospray e dotato di un analizzatore a triplo quadruplo (API 2000; AB Sciex, Germania) (figura 7).



Figura 7: Dionex UltiMate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific Inc, Italy) accoppiato ad un triplo quadrupolo (API 2000; AB Sciex, Germany).

Il campione, sciolto in un solvente polare, è nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico. Le goccioline di spray, caricate per azione del campo elettrico, si staccano dal capillare. Via via che il solvente evapora le gocce aumentano la propria densità di carica fino ad arrivare a un certo livello critico, al quale si innesca una esplosione coulombiana e gli ioni vengono espulsi dalla goccia. Qualunque sia il metodo impiegato per ionizzare il campione, il flusso di ioni prodotto entra nell'analizzatore, ossia

un dispositivo in grado di separare gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). Diversi sono i tipi di analizzatori che possono essere impiegati. Nel nostro caso è stato utilizzato un triplo quadruplo spettrometro di massa che convoglia gli ioni del campione in esame al rivelatore, sulla base del loro m/z . Nell'analizzatore di massa a quadruplo il flusso di ioni attraversa uno spazio a sezione quadrata al centro di quattro barre di metallo orizzontali parallele, alle cui coppie diagonalmente opposte vengono applicate tensioni continue di segno opposto. Il campo elettrico che ne risulta costringe gli ioni a percorrere una traiettoria oscillante diversa per ogni valore di m/z . Regolando questo campo si può selezionare il valore di m/z degli ioni che attraversano il quadruplo, quelli con m/z superiore o inferiore al valore prescelto saranno costretti a percorrere traiettorie che portano fuori dal campo elettrico e quindi a non raggiungere il rivelatore. Nello spettrometro di massa a triplo quadruplo sono presenti tre quadrupli in serie: in questa configurazione il primo ed il terzo quadruplo agiscono da filtri di massa, mentre il quadruplo centrale, riempito con un gas inerte (azoto o argon), come cella di collisione (al quadruplo centrale è applicata una radiofrequenza la cui funzione è di mantenere focalizzati gli ioni generati dalla rottura della molecola genitore).

Questo sistema, oltre a possedere le normali funzionalità di un singolo quadruplo, ne possiede ulteriori. Può infatti operare secondo diverse modalità (come "product ion scan", "parent ion scan", "neutral loss scan", "single ion monitoring", "multiple reaction monitoring") che consentono di ottenere informazioni sull'identità della molecola e di individuare inoltre classi di molecole strutturalmente simili. I parametri strumentali del triplo quadrupolo che devono essere ottimizzati sono:

- DP: differenza di potenziale tra l'orifice plate e la prima lente del filtro quadrupolare;
- EP: differenza di potenziale tra la prima e la terza lente del filtro quadrupolare;
- CE: differenza di potenziale tra la terza lente del filtro quadrupolare e la cella di collisione, quindi è la differenza di potenziale al primo quadrupolo;
- CXP: differenza di potenziale tra la cella di collisione e il terzo quadrupolo.

I primi due parametri si ottimizzano per lo ione precursore, mentre gli ultimi due si ottimizzano sia sullo ione precursore che sugli ioni prodotto, individuati dopo la frammentazione. Successivamente gli ioni passano al rivelatore, in genere si tratta di un moltiplicatore elettronico capace di amplificare la debolissima corrente prodotta dagli ioni che hanno superato l'analizzatore. I segnali ottenuti in questo modo vengono poi trasmessi ad un calcolatore in grado, con l'opportuno software, di rappresentare l'abbondanza di ogni ione in funzione della sua massa, cioè lo spettro di massa finale. Le abbondanze vengono riportate come rapporto rispetto al picco base, che è il picco più abbondante osservato nello spettro. Questo permette di avere spettri che sono in funzione solamente dell'analita e delle condizioni di analisi. Il picco base non sempre coincide col picco genitore o molecolare, che è invece il picco che corrisponde alla molecola ionizzata e che quindi consente di stabilire il peso molecolare dell'analita. Gli spettrometri di massa operano in condizioni di sottovuoto a seconda della sezione dello strumento considerata: 10^{-4} mmHg nella sezione di ionizzazione e 10^{-8} mmHg nel sistema di analisi (separazione) e nel sistema di rivelazione. L'analita viene introdotto nello strumento in ragione di pochi microgrammi, direttamente o in seguito alla cromatografia liquida in grado di separare i differenti composti.

Capitolo III

Nuovi approcci terapeutici, la silibina

3.1 “Drug in context” e definizione

Il cardo mariano (*Silybum marianum* L. Gaernt.), talvolta chiamato carciofo selvatico, è una pianta medicinale utilizzata da migliaia di anni come rimedio in una grande varietà di disturbi (88). La silimarina rappresenta l'1,5-3% del peso secco del frutto ed è una miscela isomerica di complessi flavonoidi unici: i flavonolignani. I principali rappresentanti di questo gruppo sono silimarina e silibina (chiamata anche silibinina), isosilibina, silicristina, isosilicristina e silidianina (89).

Secondo la monografia della Farmacopea Europea (EMA/HMPC/294188/2013, giugno 2018) il contenuto di silimarina corrisponde a:

- somma dei contenuti di silicristina e silidianina (entrambe C₂₅H₂₂O₁₀; Mr 482.4): dal 20% al 45%, calcolata con riferimento alla silimarina totale;
- somma dei contenuti di silibinina A e silibinina B (entrambe C₂₅H₂₂O₁₀; Mr 482.4): dal 40% al 65%, calcolata con riferimento alla silimarina totale;
- somma del contenuto di isosilibinina A e isosilibinina B (entrambe C₂₅H₂₂O₁₀; Mr 482.4): dal 10% al 20 per cento, calcolato con riferimento alla silimarina totale.

In natura, la silibina si presenta sotto forma di due diastereoisomeri trans: la silibina A e la silibina B. L'attività epatoprotettiva della silibina è stata documentata in vitro, in vivo e in studi clinici. Oltre all'azione epatoprotettiva, la silibina ha forti proprietà antiossidanti e modula una varietà di vie di segnalazione cellulare, con conseguente riduzione di mediatori pro-infiammatori (89). Il pleiotropico effetto sulla salute umana ha destato negli anni l'attenzione di molti gruppi di ricerca, consentendone l'applicazione terapeutica in una grande varietà di contesti patologici. A causa della sua struttura chimica altamente idrofoba e non ionizzabile, essa mostra una scarsa solubilità in acqua (inferiore a 50 µg/mL), condizione che determina una grande influenza sulla sua biodisponibilità (89). Dopo somministrazione orale, la silibina viene rapidamente assorbita nello stomaco (con una T-max di circa 2-4 h e un t_{1/2} di circa 6-8 h). Tuttavia, come accennato in precedenza, l'efficienza di assorbimento è piuttosto bassa (90). Studi condotti su modelli di ratto

hanno dimostrato che la biodisponibilità orale assoluta della forma pura di silibina è di circa lo 0,95% (91). La biodisponibilità della silibina nel tratto gastrointestinale dipende da vari fattori, come la concentrazione del preparato e la presenza di ulteriori sostanze con carattere solubilizzante (es. grassi, proteine, amminoacidi, colesterolo o altri flavonoidi) (92).

Per aumentare la biodisponibilità, la silibina viene combinata con l'eccipiente lecitina di soia contenente fosfatidilcolina (30%) e una miscela di lipidi polari (fosforo e glicole) e una piccola quantità di carboidrati (Epikuron) (93).

3.2 Studi pre-clinici

In una grande varietà di studi editi a pubblicazione, l'uso della silibina è stato associato principalmente ad attività antiossidante e di scavenging dei radicali liberi, ma anche attività antinfiammatoria, compresa la modulazione del pathway del fattore nucleare κ B (NF- κ B), l'inibizione della funzione delle cellule di Kupffer e l'inibizione della produzione o del rilascio di ossido nitrico (NO), fattore di necrosi tumorale e citochine infiammatorie cellulari (89). In modelli animali di danno epatico causato da vari agenti come alcol, ferro, ischemia, tetracloruro di carbonio, arsenico, cisplatino e doxorubicina, la silimarina e la silibina hanno esercitato significativi effetti epatoprotettivi ed antifibrotici (89). Trappoliere et al. nel 2009, in un consolidato modello in vitro di fibrogenesi epatica umana, hanno dimostrato proprietà antifibrotiche dirette e indirette della silibina sia attraverso la riduzione degli effetti proliferativi e profibrotici indotti da PDGF. Inoltre, il PDGF, in HSC umane attivate, ha indotto un marcato aumento della fosforilazione di ERK, MEK, Raf, Akt e la silibina, a qualsiasi concentrazione utilizzata, ha inibito la fosforilazione di ERK, MEK e Raf coinvolte nella proliferazione, migrazione e deposizione di collagene (94). La silibina è in grado di ridurre la sintesi de novo indotta da TGF- β del collagene di tipo I, il principale componente fibrillare della matrice extracellulare (94). Le cellule stellate possono anche amplificare l'infiammazione sintetizzando varie citochine e chemochine come la proteina-1 chemiotattica dei monociti (MCP-1), ICAM-1 e l'interleuchina (IL)-8 (95). L'espressione di MCP-1 è direttamente correlata al numero di monociti

che infiltrano il tratto portale durante l'epatite cronica essendo, inoltre, implicato nella patogenesi della steatoepatite non alcolica (NASH) e resistenza insulinica (96). IL-8, un'altra chemochina secreta dalle HSC, è una potente attivatrice chemiotattica per i neutrofili e linfociti (97). La silibina inibisce la sintesi indotta da IL-1 di MCP-1 ed IL-8 umana in modo dose-dipendente, svolgendo così un'attività antinfiammatoria potenzialmente rilevante nel contesto delle epatopatie croniche. L'NF- κ B attivo è coinvolto nella regolazione trascrizionale dei geni MCP-1 e IL-8 in seguito a stimolazione con IL-1. Pertanto, è stato studiato se la silibina è in grado di influenzare l'attivazione di questo regolatore trascrizionale. Il fattore di trascrizione NF- κ B è presente nel citosol in uno stato inattivo connesso con le proteine inibitorie I κ B. L'attivazione avviene tramite la fosforilazione di I κ B- α , attivata da diversi segnali extracellulari tra cui citochine infiammatorie, fattori di crescita e chemochine, seguita dalla degradazione mediata dal proteasoma, con conseguente rilascio e traslocazione nucleare del fattore attivato. Poiché la fosforilazione di I κ B- α è essenziale per il rilascio di NF- κ B attivo, la fosforilazione di questa molecola rappresenta un eccellente marker dell'attivazione di NF- κ B. IL-1 β induce un marcato aumento della fosforilazione di I κ B- α , mentre la pre-incubazione con silibina ha completamente inibito questo effetto. Questa prova suggerisce che la silibina è potenzialmente in grado di contrastare la segnalazione intracellulare che porta all'amplificazione dell'infiammazione tipica delle HSC attivate (98). Salomone et al hanno dimostrato che la silibina è in grado di ridurre la lipotossicità epatica modulando l'espressione e l'attività degli enzimi metabolici chiave in tale processo. È importante sottolineare che la capacità antiossidante della silibina contrasta efficacemente i possibili effetti dannosi di un alto tasso di catabolismo dei grassi che viene stimolato nel tentativo di ridurre l'accumulo di acidi grassi in eccesso. Questo passaggio avviene neutralizzando i radicali liberi prodotti dalle reazioni di ossidazione dei grassi, rendendo quindi superflua la sintesi dei trigliceridi come protezione contro gli effetti tossici e proapoptotici degli acidi grassi in eccesso (99). In un modello sperimentale di topi db/db alimentati con una dieta carente di metionina-colina (MCD) la silibina ha ridotto significativamente l'aumento dei livelli sierici di ALT, migliorato l'HOMA-IR e l'istologia epatica (99). I topi db/db alimentati con una dieta MCD hanno mostrato

una ridotta espressione epatica di enzimi metabolici chiave coinvolti nell'omeostasi lipidica. La somministrazione di silibina ha fortemente indotto l'espressione genica di SCD-1 (l'enzima che converte gli acidi grassi saturi in acidi grassi monoinsaturi), L-FABP e AOX.

3.3 Studi Clinici

Le malattie del fegato sono di grande rilevanza in quanto il numero di pazienti affetti da danno epatico tossico indotto da alcol o altri agenti tossici e da infezioni virali è in continuo aumento. La silibina ha dimostrato, in modelli clinici, potenti proprietà antiossidanti proteggendo la membrana cellulare dai danni indotti dai radicali e bloccando l'assorbimento delle tossine. Studi condotti su pazienti con malattie del fegato hanno dimostrato che la silibina aumenta l'attività della superossido dismutasi dei linfociti e degli eritrociti, contribuendo, inoltre, all'aumento dei livelli sierici di glutatione e glutatione perossidasi (100). Dal punto di vista strettamente metabolico, il trattamento con silibina è stato associato ad una riduzione dell'insulino-resistenza ed una diminuzione significativa dei livelli di insulina circolante a digiuno, suggerendo un profondo effetto sull'omeostasi glucidica (101). Uno studio clinico multicentrico, di fase III, in doppio cieco con silibina complessata a fosfolipidi è stato dimostrato su 179 pazienti affetti da NAFLD documentata istologicamente, un miglioramento statisticamente significativo degli indici di citonecrosi epatica oltre che della sensibilità all'insulina. Dal punto di vista istologico, la somministrazione di silibina per 12 mesi ha portato ad un netto vantaggio in termini di riduzione di infiammazione lobulare, ballooning, steatosi e fibrosi, che, allo stato attuale, rappresenta il più importante fattore prognostico in questo contesto (102).

Inoltre, Stiuso et al (Stiuso et al., 2014) hanno valutato, in pazienti con NASH istologicamente documentata, le differenze in termini di composizione del profilo lipidomico sia in condizioni basali che dopo 12 mesi di trattamento con silibina + fosfolipidi. Lo studio suggerisce che, nonostante caratteristiche cliniche, biochimiche e istologiche apparentemente simili, i pazienti siano differenziabili sulla base del profilo lipidico ematico, rilevando, nello specifico, due distinti gruppi. Gli stessi gruppi hanno, inoltre, dimostrato una diversa sensibilità al trattamento. Il gruppo

1 è stato caratterizzato da una perossidazione lipidica inferiore come valutato dal dosaggio delle specie reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS), mentre il gruppo 2 ha mostrato valori più elevati di TBARS con valori di attività normali degli enzimi scavenger. Valori inferiori di TBARS nel siero del gruppo 1 possono essere dovuti ad un maggiore accumulo intracellulare epatico di FFA circolanti, mobilitati dall'insulino-resistenza, che non vengono metabolizzati, come dimostrato dal significativo aumento all'istologia con colorazione Red Oil. Nel gruppo 2 con valori di TBARS più elevati, l'accumulo in epatociti di FFA circolanti, mobilitati dall'insulino-resistenza, comporta il loro parziale metabolismo con produzione di aldeidi tossiche e loro successivo rilascio in circolo (103). Il trattamento cronico con silibina e fosfolipidi ha indotto cambiamenti dello stato ossidativo sierico, dei parametri metabolici e del punteggio NAS in entrambi i gruppi. Nel gruppo 1, il trattamento ha aumentato significativamente i livelli sierici medi sia di TBARS che di NO che hanno superato i valori medi registrati nei soggetti sani. Nel secondo gruppo di pazienti con NASH il trattamento con ha ridotto significativamente i valori medi di TBARS mentre i valori medi di NO non sono stati quasi influenzati dal trattamento. Inoltre, solo nel gruppo 2 i valori medi di BMI, insulina e HOMA sono significativamente diminuiti (103). È stato, inoltre, valutato il profilo lipidomico in entrambi i gruppi. Il livello di lisofosfatidilcolina (lysoPC) all'interno dell'acido palmitico non era significativamente diverso tra i gruppi studiati. Tuttavia, le specie lipidiche come colesterolo libero, sfingomieline (SM) e fosfatidilcolina (PC) nei pazienti con NASH a T0 (gruppo 1 e gruppo 2) erano sostanzialmente diminuite rispetto a quelle dei soggetti sani. Solo i pazienti NASH del gruppo 2 dopo 12 mesi di trattamento con Realsil hanno mostrato un profilo lipidico simile a quello dei soggetti sani con un ripristino dei valori di colesterolo libero, lysoPC, SM e PC (103).

Capitolo IV

Studio sperimentale

4.1 Scopo dello studio

I coorte di pazienti affetti da NAFLD documentata istologicamente:

Valutazione del ruolo di BPA come fattore responsabile della progressione della NAFLD.

II coorte di pazienti affetti da NAFLD documentata istologicamente:

- Valutare l'effetto derivato dalla somministrazione per sei mesi di silibina complessata con vitamina D e vitamina E (RealSIL 100D®) su markers metabolici, di stress ossidativo, disfunzione endoteliale e peggioramento di malattia in pazienti NAFLD esposti al BPA.
- Valutare l'effetto della genetica, con particolare riferimento ai seguenti single nucleotide polymorphisms: PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926 ed MBOAT7 rs641738 sulla risposta terapeutica alla somministrazione di silibina complessata con vitamina D e vitamina E (RealSIL 100D®).

4.2 Materiali e metodi coorte I

4.2.a Pazienti

Questo studio prospettico è conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki (1975) ed è stato approvato dal comitato etico dell'Università della Campania "L. Vanvitelli" di Napoli (protocollo n. 4. 07 gennaio 2016). Sessanta pazienti consecutivi con diagnosi istologica di NAFLD con o senza DM2 che rispettavano i criteri di inclusione/esclusione sono stati arruolati nello studio dopo aver firmato un consenso informato.

I criteri di inclusione erano:

- presenza di diagnosi istologica di NAFL o NASH con o senza DM2 e/o SM.

I criteri di esclusione erano:

- gravi complicanze legate al diabete (es. malattia renale cronica in stadio IV, retinopatia diabetica proliferativa, infezioni, piede diabetico, ecc.);
- gravi patologie sistemiche;
- consumo di alcol o droghe;
- diagnosi di altre cause di danno epatico cronico;
- problemi psicologici/psichiatrici tali da invalidare il consenso informato.

Sono state escluse altre cause di danno epatico attraverso un'attenta raccolta anamnestica, saggi biochimici per altre epatopatie croniche ed attraverso l'analisi del campione istologico, che, contemporaneamente, ci ha permesso inoltre di stadiare la fibrosi secondo Metavir. Sono stati raccolti dati anamnestici relativi a consumo di alcol, assunzione di droghe, trattamenti farmacologici in corso o pregressi, fumo di sigaretta. Sono stati inoltre valutati: pressione sanguigna, indice di massa corporea (BMI) e rapporto vita-altezza (WHtR). Sono inoltre stati effettuati test di laboratorio routinari (glicemia e insulina, colesterolo totale, lipoproteine ad alta densità, trigliceridi, AST, ALT, gamma-GT, emocromo) prelevando campioni venosi periferici di sangue.

4.2.b Saggi di laboratorio ed analisi nutrizionale

Abbiamo valutato i seguenti marcatori di stress ossidativo in sieri dei pazienti prima e dopo la dieta priva di BPA:

- Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (104). Il test è stato eseguito con 10 uL di siero. La quantità di TBARS è stata espressa come nmol/ug di proteine e i dati presentati come media (M) \pm deviazione standard (SD);
- attività di SPD e CAT nei sieri dei pazienti (105). Per entrambi i saggi, i campioni sono stati in precedenza diluiti con tampone (1:10 di siero). L'attività di un'unità di SOD è stata definita come la quantità di enzima necessaria per ridurre del 50% la quantità del radicale superossido. Tale saggio ha misurato l'attività di tutti e tre i tipi di superossido dismutasi (Cu/Zn, Mn e Fe SOD);
- l'attività di un'unità di CAT è stata definita come quantità di enzima necessaria alla formazione di 1,0 nmol di formaldeide al minuto a 25 ° C. I valori sono stati riportati come U / ug di proteine.

Sono stati raccolti anche campioni di sangue e urina per valutare la concentrazione plasmatica e urinaria di BPA. L'urina è stata raccolta in appositi contenitori di vetro BPA-free per 24 ore e la concentrazione di BPA rilevata è stata corretta per i valori di creatinina. La quantità di plasma usato per le analisi è stata di 2,5 ml e la quantità di urina 3 ml. Abbiamo inoltre valutato il tasso di escrezione del BPA utilizzando la seguente formula: quantità per ml di BPA nelle urine delle 24 ore x volume urinario totale su 24 ore/24. Abbiamo espresso i risultati come media \pm SD e confrontato i valori prima e dopo la dieta BPA-free. Abbiamo inoltre valutato eventuali cambiamenti nei livelli di BPA derivanti dal seguire una dieta BPA-free per almeno un mese.

La composizione dietetica quotidiana è stata valutata mediante un programma elettronico (WinFood, Medimatica s.r.l., Martinsicuro, Italia), prima e dopo dieta BPA-free. Sulla base della quantità e della qualità del cibo consumato il programma elabora l'apporto energetico e calcola la percentuale di macronutrienti e micronutrienti contenuti in ogni alimento.

Abbiamo registrato l'assunzione di cibo per una settimana completa, incluso giorni lavorativi e il fine settimana. I dati sono stati confrontati con le tabelle di consumo alimentare e assunzioni dietetiche raccomandate della Banca dati dell'Istituto Nazionale Italiano di Nutrizione e Composizione Alimentare in Italia. L'uso di alcol è stato valutato con un questionario standardizzato (test AUDIT completo) (106). La quantità di alcol giornaliero assunto è stata calcolata sulla base dell'unità "drink" che corrisponde a circa 12 g di etanolo puro (107). La composizione corporea è stata valutata con analisi di bioimpedenza (BIA 101S). Per ottenere plasma senza cellule abbiamo centrifugato sangue miscelato ad anticoagulante prelevato da ogni soggetto mediante puntura venosa dopo 12 ore di digiuno. Tale campione è stato centrifugato immediatamente dopo il prelievo per 15 minuti a 2000 rpm. Dopo centrifugazione, il plasma è stato separato dalla parte corpuscolare. I campioni di plasma con acido etilendiamminoceraacetico (EDTA) sono stati conservati in fiale di vetro a -80 ° C fino allo scongelamento per analisi. Il campione di urina è stato raccolto da ciascun soggetto e conservato congelato in fiale di vetro a -20 °C fino all'analisi. Per l'analisi dettagliata del BPA sono stati pubblicati i metodi, incluso il sistema di controllo della qualità che è stato utilizzato per monitorare le prestazioni del metodo e per prevenire errori di quantificazione (108, 109). In breve, i campioni di plasma sono stati sottoposti a estrazione liquida di BPA con metanolo (1: 1, v / v), quindi in cartuccia di estrazione in fase solida (AFFINIMIP Bisphenols, Polyntell SA, Parigi, Francia) per la pulizia e concentrazione. La purificazione del BPA dalle urine è stata eseguita in due passaggi:

- de-coniugazione enzimatica degli addotti BPA-glucuronide/solfato;
- estrazione in fase solida su colonne AFFINIMIP SPE.

L'analisi è stata poi completata con HPLC DionexUltiMate 3000, sistema accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (API 2000; AB Sciex, Germania). Una colonna Kinetex F5 (100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex, Italia) di acciaio inossidabile è stata utilizzata per separazioni in fase inversa. La cromatografia è stata eseguita a temperatura ambiente mediante gradiente lineare di eluizione in acqua e metanolo. Gli analiti sono stati quantificati in modalità di monitoraggio di reazioni multiple, in base alle condizioni di lavoro riportato da Nicolucci et al,

2017 (108). Tutti i campioni sono stati analizzati in triplice copia con deviazioni standard relative (RSD) inferiori al 13%.

4.2.c Test di proliferazione cellulare e test TBARS

Cellule HepG2 sono state usate per studiare lo stress ossidativo indotto da BPA (110).

Le cellule sono state coltivate in terreno di coltura RPMI 16/40 (alta concentrazione di glucosio) e DMEM (bassa concentrazione di glucosio) contenente nutrienti di base (glucosio, aminoacidi, minerali e vitamine) per simulare in vitro una condizione di alta e bassa glicemia plasmatica e valutare la diversa risposta delle cellule all'esposizione al BPA (111). Le colture trattate sono state arricchite con siero bovino fetale al 10%, 1% di L-glutamina e 1% di aminoacidi non essenziali. Le cellule sono state esposte al BPA a due diverse concentrazioni (0.025 e 0.05 μ M) per 48 e 72 h. I controlli sono stati costituiti da cellule trattate con etanolo allo 0.1%. Per testare la vitalità cellulare è stato usato il saggio colorimetrico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro). Il saggio MTT è un metodo semplice ed efficace per determinare i tassi di crescita cellulare basato sulla riduzione mitocondriale dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale, succinato-deidrogenasi FAD-dipendente (SDH). Questa reazione chimica può avvenire solo in cellule metabolicamente attive. Il valore della densità ottica può essere relazionato al numero di celle presenti vitali. La frazione di HepG-2 è stata risospesa nel tampone di lisi (10⁶ cellule/mL) contenente 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Nonidet, 1% SDS, 1 μ M leupeptina, fenilmetilsolfonilfluoruro 100 μ M, 1 μ M di pepstatina A, 100 μ M EDTA. I campioni (50 μ g) sono stati separati da SDS-10% mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e trasferita in membrana di nitrocellulosa (fogli 0.45 IM, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 100 V. I campioni ottenuti sono stati fissati durante la notte in soluzione salina tamponata con Tris (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5) contenente albumina sierica bovina al 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Stati Uniti). Dopo diversi lavaggi, la membrana è stata sviluppata con un reagente luminol potenziato (Du-Pont, NEN) ed esposto a Kodak Film X-Omat. I risultati dell'Western blot ottenuti sono stati confermati mediante quantificazione dei dati con il software SIGMA GEL. Il

dosaggio TBARS è un metodo colorimetrico consolidato per monitorare la perossidazione lipidica attraverso la quantificazione dei prodotti di perossidazione lipidica, in particolare malondialdeide. I lisati di cellule HepG2 sono stati sottoposti a questo test dopo l'esposizione al BPA. Il reagente è stato ottenuto sciogliendo acido tiobarbiturico allo 0,37% (18,7 ml) con 15% (9 ml) di acido acetico e 2,3 ml di acido cloridrico 0,12 N (per raggiungere un volume finale di 30 ml). In ogni pozzetto è stato aggiunto 1 ml di reagente più 1 ml di ogni campione. Dopo incubazione a 100 ° C per 30 minuti, tutti i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione a 15000 rpm per 10 minuti. Il cromogeno (TBARS) è stato determinato spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda (λ) di 532 nm.

4.2.d Trattamento con BPA delle cellule HepG2 incubate con acidi grassi

La definizione istologica di steatosi è l'accumulo visibile di goccioline lipidiche in oltre il 5% degli epatociti. Per determinare se il BPA fosse in grado di indurre la steatosi, le cellule HepG2 sono state poste in coltura per 72 ore con BPA 0.05 μ M e acidi grassi saturi ed insaturi in due diversi esperimenti, paragonando i risultati rispetto ai controlli. Il metodo Oil Red O (ORO) è stato utilizzato per il rilevamento di lipidi intracellulari.

4.2.e Dimensione del campione ed analisi statistica

Lo studio che ha convalidato la quantizzazione dei livelli urinari di BPA con il metodo brevettato, identificando come valori di riferimento 0.48 ± 0.16 ng/mL in condizioni normali di peso in soggetti giovani e 0.79 ± 0.16 in soggetti giovani obesi (109). Sulla base di questa differenza, abbiamo stimato che 30 pazienti per ogni braccio dello studio sarebbe il giusto numero di soggetti da arruolare per identificare una differenza significativa nei livelli di BPA, con un errore alfa di 0.01 e una potenza statistica del 90% (STATA 10 per MacIntosh, Dimensione del campione e potenza). Sono state eseguite analisi statistiche utilizzando il programma statistico per le scienze sociali (SPSS) vs 18.0. Il test t di Student e il test U di Mann-Whitney sono stati eseguiti per il

confronto di variabili continue. La significatività statistica è stata definita come $p < 0.05$ in un test a due code con un intervallo di confidenza al 95%.

4.3 Materiali e metodi coorte II

Questo studio prospettico è conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki (1975) ed è stato approvato dal comitato etico dell'Università della Campania "L. Vanvitelli" di Napoli (protocollo no. 531/2016). 90 pazienti consecutivi con diagnosi istologica di NAFLD e 60 pazienti con diagnosi di malattia da reflusso (non in terapia) come controlli sani seguiti presso l'UOC di Epato-gastroenterologia dell'Università della Campania "L. Vanvitelli" sono stati arruolati tra gennaio e ottobre 2017, secondo criteri di inclusione/esclusione, dopo aver firmato il consenso informato. I pazienti con NAFLD sono stati randomizzati in due gruppi: trattati (60 pazienti) e non trattati (30 pazienti) (rapporto 2 : 1 trattati vs. non trattati). I criteri di inclusione erano l'età tra i 18 e gli 80 anni e la diagnosi di NAFLD. I criteri di esclusione erano: l'uso di epatoprotettori, presenza di tumori o malattie infiammatorie croniche come malattie infiammatorie intestinali, artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico o altre importanti malattie sistemiche; infezioni in corso; malattia renale acuta o cronica; storia di abuso di alcol o droghe; altre cause di danno epatico cronico; problemi psicologici/psichiatrici che avrebbero potuto invalidare il consenso informato. La definizione della presenza/assenza di NAFLD e la stadiazione della malattia sono state effettuate dopo l'esclusione di altre cause di malattie del fegato grazie a test sierologici, dati clinici ed eseguendo una biopsia epatica. Peso, altezza e rapporto vita-altezza (WHtR) sono stati misurati direttamente utilizzando dispositivi standardizzati. Anche l'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato dividendo il peso (kg) per il quadrato dell'altezza (m). Dati aggiuntivi inclusi test di laboratorio di routine (glicemia e insulina, ferritina, proteina C reattiva (CRP), colesterolo totale, lipoproteine a bassa densità (LDL), trigliceridi, aspartato (AST) e alanina aminotransferasi (ALT), gamma glutamiltranspeptidasi (γ GT), emocromo e vitamina D) e sono stati ottenuti da campioni di sangue venoso periferico. L'insulinoresistenza è stata valutata con il calcolo dell'HOMA-IR. NAFLD fibrosis score (NFS) e FIB-4 sono stati calcolati secondo le formule specifiche (112). Non

è stato prescritto nessun tipo di regime dietetico o esercizio fisico durante il periodo di studio, sia per i pazienti trattati che per i controlli. Tutti i parametri analizzati sono stati ripetuti alla valutazione basale (T0), dopo 6 mesi di terapia (T6) e alla fine del periodo di follow-up (T12), in assenza di terapia.

4.3.a Valutazione istologica.

L'assenza o la presenza di NASH è stata valutata secondo lo standard istopatologico e la gravità della malattia è stata valutata calcolando il NAFLD activity score (NAS) stabilito da Kleiner, come somma dei punteggi di steatosi, infiammazione lobulare e ballooning (113). La diagnosi di NASH è stata effettuata per $NAS > 5$. La fibrosi è stata valutata secondo Brunt et al. come stadio 0 (nessuno), stadio 1 (zona 3 fibrosi perisinusoidale o portale), stadio 2 (zona 3 fibrosi perisinusoidale e periportale senza bridging) o stadio 3 (fibrosi a ponte). È stato valutato il rigonfiamento degli epatociti come 0 (nessuno), 1 (pochi) o 2 (molti) (114).

4.3.b FibroScan e controlled attenuation parameter

È stata eseguita l'elastografia transitoria (TE) utilizzando il FibroScan versione 502 (Echosens, Paris, Francia) con sonde standard (sonde M e XL) (115). La sonda XL è stata utilizzata quando la distanza dalla pelle alla capsula epatica superava 2,5 cm, e/o quando il BMI era >30 . È stato eseguito il FibroScan da un medico esperto non informato sui risultati del quadro istologico. I criteri proposti da Boursier et al. sono stati usati per considerare la misura “molto affidabile” ($IQR/M \leq 0:1$), “affidabile” ($0:1 < IQR/M \leq 0:3$ o $IQR/M > 0:3$ con LS mediana $< 7:1$ kPa), o “poco affidabile” ($IQR/M > 0:3$ con Mediana LS $\geq 7:1$ kPa) (116). Sulla base del controlled attenuation parameter (CAP), abbiamo classificato i pazienti arruolati in S0, nessuna steatosi (0%-10% di grassi; 0-237 dB/m); S1, lieve steatosi (11%-33% di grassi; 238-259 dB/m); S2, steatosi moderata (34%-66% di grassi; 260-292 dB/m); e S3, steatosi grave ($>67\%$ di grassi; ≥ 293 dB/m) secondo il calcolo dell'attenuazione dei segnali ultrasonici utilizzati per TE (117).

4.3.c Valutazione nutrizionale

In tutti i soggetti, l'assunzione di cibo è stata valutata con l'utilizzo di un programma elettronico (WinFood, Medimatica s.r.l., Martinsicuro, Italia). In base alle quantità e qualità degli alimenti consumati, il programma elabora l'intake calorico e la percentuale di macronutrienti e micronutrienti. Abbiamo registrato l'assunzione di cibo durante una settimana completa, compresi i giorni lavorativi e il fine settimana. I dati sono stati confrontati con le tabelle dei consumi alimentari e gli apporti dietetici raccomandati dell'Istituto Nazionale Italiano di Nutrizione e Composizione degli Alimenti (118). Il consumo di alcol è stato valutato con un questionario precodificato standardizzato (test AUDIT completo) (119). La valutazione è stata ripetuta alla valutazione basale (T0), dopo 6 mesi (T6), e alla fine del periodo di follow-up (T12).

4.3.d Valutazione dei thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Il test è stato eseguito utilizzando 10 µl di siero. Il TBARS cromogeno è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 532 nm con 1,1,3,3-tetrametossiprofano come standard. Il quantitativo di TBARS è stato espresso come nmol/µg di proteine. Tutti i parametri analizzati sono stati ripetuti alla valutazione basale (T0), dopo 6 mesi (T6) e alla fine del periodo di follow-up (T12).

4.3.e Marcatori di peggioramento di malattia e disfunzione endoteliale

Abbiamo determinato il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- α), TGF- β , interleuchina- (IL-) 18, IL-22, metalloproteinasi di matrice 2 (MMP-2), recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), fattore di crescita insulinico-II (IGF-II), cluster di differenziazione- (CD-) 44, HMGB-1 e concentrazione di Endocan dopo raccolta di campioni di sangue periferico e centrifugazione per l'estrazione del siero. I sieri sono stati testati con immunoassorbimento (ELISA), secondo le indicazioni del produttore. Tutti i parametri analizzati sono stati ripetuti al basale (T0) valutazione, dopo 6 mesi (T6) e alla fine del periodo di follow-up (T12).

4.3.f Disegno sperimentale

Abbiamo eseguito una valutazione al baseline dei parametri analizzati tra i pazienti NAFLD ed il gruppo di controllo sano. Tra i pazienti con NAFLD arruolati, 60 sono stati randomizzati per ricevere la somministrazione orale di RealSIL 100D® (303 mg di complesso silibina-fosfolipide, 10 ug di vitamina D e 15 mg di vitamina E) due volte al giorno per sei mesi e 30 pazienti NAFLD come gruppo di controllo. La quantità di vitamina E nella molecola farmacologica non viene utilizzata per ottenere un effetto terapeutico a causa del suo basso dosaggio, quanto, piuttosto come stabilizzante chimico del composto. Tutti i pazienti sono stati seguiti per ulteriori 6 mesi senza terapia (T12). Al baseline, abbiamo eseguito una valutazione nutrizionale. Durante il periodo dello studio, i pazienti sono rimasti a dieta libera in base alle abitudini alimentari precedenti l'arruolamento e non è stato prescritto alcun tipo di esercizio fisico. Inoltre, abbiamo eseguito al basale (T0), alla fine del periodo di trattamento (T6) e dopo sei mesi del follow-up (T12) la valutazione di fibrosi/steatosi epatica oltre che una valutazione clinica, biochimica, dello stress ossidativo e disfunzione endoteliale. Nella valutazione di tutti i parametri studiati, abbiamo considerato come “migliorata” la normalizzazione della specifica variabile al di sotto del limite superiore del livello di normalità.

4.3.g Analisi statistica

Il numero di pazienti (90; 60 nel braccio interventistico e 30 in quello osservazionale) è stato calcolato sulla base di uno degli endpoint dello studio, vale a dire, la riduzione del CAP. È stata calcolata una presunta “riduzione significativa” sulla base degli studi di convalida del CAP, che hanno mostrato come una differenza di circa 20 dB/m potesse essere considerata come significativa (120). Sulla base di questi dati, abbiamo calcolato che il numero di pazienti necessari per evidenziare una differenza statisticamente significativa tra prima e dopo trattamento, con una potenza del 90% ed un errore alfa di 0,01 in un test a due code per campioni appaiati in misure ripetute è stato di 27 pazienti per braccio (calcolo eseguito con pacchetto STATA v14 per Mac).

Successivamente, per migliorare le possibilità di raccogliere differenze significative anche su parametri di laboratorio, si è deciso di arruolare 30 pazienti nel braccio di controllo e raddoppiare il numero (60) nel braccio trattato. Sono stati eseguiti test parametrici e non parametrici per confrontare le variabili continue quando appropriato. In particolare, il test t di Student e il test U di Mann-Whitney sono stati eseguiti per confrontare variabili continue; chi-quadrato con correzione di Yates o il test esatto di Fisher sono stati eseguiti per confrontare le variabili categoriche. I dati sono stati riportati come media \pm deviazione standard per variabili continue con distribuzione normale e come mediana e intervallo per quelli con distribuzione "non normale". Per valutare le variabili erano normalmente o non normalmente distribuite, abbiamo eseguito preliminarmente test di adattamento di bontà di Kolmogorov-Smirnov per la normalità. La significatività statistica è stata definita quando p è risultata < 0.05 in un test a "due code" con 95% di intervallo di confidenza. Sono state eseguite analisi statistiche utilizzando il programma statistico SPSS® 20.0 per Macintosh® (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4.4 Materiali e metodi: subanalisi sui pazienti non responder

4.4.a Pazienti

Un totale di 102 pazienti con diagnosi istologica di NAFLD (ottenuti negli ultimi 6 mesi prima dell'arruolamento) seguiti dalla Divisione di Epato-gastroenterologia dell'Università della Campania "Luigi Vanvitelli, tra gennaio e ottobre 2017 sono stati screenati, dopo aver firmato un consenso informato, per varianti genetiche PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, e MBOAT7 rs641738 e, tra queste, 32 sono risultati idonei in accordo con i criteri di inclusione per lo studio ed hanno mostrato almeno una mutazione tra PNPLA3 I148I/M, I148M/M, TM6SF2 167E/K, 167K/K e MBOAT7 TMC4C/T o TMC4T/T, sono stati arruolati insieme a 60 pazienti wild type. Quindi, i pazienti sono stati divisi in tre diversi gruppi: gruppo NAFLD di controllo wild type, gruppo NAFLD wild type trattato e gruppo NAFLD mutato trattato, composto da pazienti portatori di almeno una delle mutazioni di cui sopra. Dieci pazienti sono stati esclusi dall'arruolamento a

causa della coesistenza di più comorbidità e/o stadi avanzati di malattia epatica come cirrosi e/o carcinoma epatocellulare. La definizione della presenza/assenza di NAFLD e la stadiazione sono stati valutati eseguendo una biopsia epatica, test sierologici e la raccolta di dati clinici.

4.4.b Estrazione del DNA genomico da campioni di sangue periferico

L'estrazione del DNA genomico da campioni di sangue periferico è stata eseguita utilizzando il kit di estrazione PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen di Life Technologies, Stati Uniti). La quantità di DNA di ogni campione è stata valutata mediante spettrofotometro (NanoDrop Thermo Fisher Scientific) utilizzando una lunghezza d'onda di 260 nm. La presenza di contaminazione del campione è stata valutata utilizzando una valutazione alla lunghezza d'onda di 280 nm e tutti i campioni hanno mostrato un buon grado di purezza perché il rapporto 260/280 era compreso tra 1,8 e 2. Il DNA estratto è stato quindi conservato in un congelatore a -20°C fino all'analisi dei polimorfismi.

4.4.c Genotipizzazione PCR real time

L'analisi degli SNP, utilizzando il codice di accesso alla banca dati TM6SF2 rs58542926 (SNP 1), MBOAT7 rs641738 (SNP2), PNPLA3 rs738409 (SNP3), è stato eseguito utilizzando la genotipizzazione RealTime PCR con TaqMan (Applied Biosystem) per sonde c_89463510_10 per SNP 1, c_8716820_10 per SNP 2 e c_7241_10 SNP 3. Tutte le valutazioni sono state fatte in tre fasi: amplificazione PCR del DNA, identificazione allelica e analisi del punto finale con curva di fusione. La prima fase è stata eseguita utilizzando l'AmpliTaq Gold DNA polimerasi contenuta nella TaqMan Universal PCR Master Mix, amplificando la sequenza bersaglio da specifici primer c. Ogni esperimento è stato fatto in triplice copia. Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando il sistema StepOne™ Real Time PCR (Applied Biosystems). La valutazione della genotipizzazione si basa sulla discriminazione allelica grazie ad una diversa fluorescenza del primer genico specifico. Per l'analisi dei risultati è stato utilizzato il software StepOne™2.0

4.4.d Disegno sperimentale

Abbiamo eseguito un confronto al baseline di peso, rapporto circonferenza vita-altezza (WHtR), misurazione della pressione sanguigna, BMI, glicemia, insulina, HOMA-IR, AST, ALT, GGT, emocromo, proteina C-reattiva (CRP), TBARS, Fibroscan, e CAP tra i tre gruppi di studio: gruppo di controllo di tipo wild type NAFLD (n. 30), NAFLD wild type trattato con (n. 30) e gruppo NAFLD mutato trattato (n. 32). Il metodo di randomizzazione a blocchi è stato utilizzato per randomizzare i 60 pazienti NAFLD wild type nel braccio di controllo e nel braccio di trattamento, utilizzando il software di randomizzazione online <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>. Il gruppo di controllo wild-type era composto da pazienti NAFLD senza mutazioni PNPLA3, TM6SF2 e MBOAT3 che non ha ricevuto alcun tipo di trattamento durante lo studio. I pazienti inseriti nel gruppo NAFLD wild type trattati e NAFLD mutati trattati, sono stati sottoposti alla somministrazione orale di 303mg di complesso silibina/fosfolipidi, 10 µg di vitamina D e 15 mg di vitamina E) due volte al giorno per 6 mesi. Nessuno dei pazienti arruolati ha abbandonato lo studio. Alla fine del trattamento, la valutazione di WHtR, pressione sanguigna, BMI, glicemia e insulina, HOMA-IR, AST, ALT, GGT, emocromo, CRP, TBARS, Fibroscan e CAP sono stati rieseguiti. Durante l'osservazione sperimentale, i pazienti sono stati mantenuti a dieta libera in base alle abitudini alimentari prima dell'arruolamento e non è stato raccomandato alcun tipo di esercizio fisico nel periodo di studio. L'assunzione di cibo è stata valutata sia al basale che alla fine del trattamento tramite software (WinFood, Medimatica s.r.l., Martinsicuro, Italia). Il consumo di alcol è stato valutato all'inizio e al fine del trattamento. L'intero protocollo di studio è disponibile su <https://www.Clinicaltrials.gov>.

4.4.e Analisi statistica

Il rischio relativo (RR) di una risposta terapeutica utile è stato calcolato considerando le variabili confondenti (età, sesso, comorbidità, farmaci, rigidità epatica e CAP). La significatività statistica è stata definita come $p < 0,05$ in un test a due code con 95% di intervallo di confidenza.

4.5 Risultati coorte I

4.5.a Studio clinico

Sulla base degli scopi di questo studio abbiamo arruolato 60 pazienti che possedevano i criteri di inclusione e 60 soggetti sani. Le caratteristiche demografiche della nostra popolazione in studio sono riportate nella Tabella 1. I pazienti NAFLD hanno mostrato livelli più elevati di colesterolo, trigliceridi, AST e ALT rispetto ai controlli. Il BPA era significativamente più elevato nei soggetti NAFLD rispetto ai controlli nelle urine (6.17 ± 0.85 ng/mL contro 0.80 ± 0.17 ng / mL rispettivamente; $p < 0.0001$) e nel plasma (5.30 ± 0.78 ng/mL contro 0.36 ± 0.06 ng/mL rispettivamente; $p < 0.0001$) (Figura 8).

	Normal liver subjects	NAFLD patients	NASH patients	P-value NAFLD vs controls	P-value NASH vs controls
Number	60	60	30	—	—
Age (y)	54 ± 13	57 ± 11	56 ± 8	n.s.	n.s.
Gender M/F	28/32	31/29	18/12	—	—
Height (cm)	165.48 ± 6.50	168.23 ± 7.49	166.13 ± 5.45	n.s.	n.s.
Body mass index	22.64 ± 2.45	29.38 ± 4.15	28.02 ± 1.45	<0.0001	<0.0001
Waist circumference (cm)	82.32 ± 6.30	104.08 ± 8.54	102.76 ± 9.14	<0.0001	<0.0001
Waist/Height ratio	<0.5	>0.65	>0.68	<0.0001	<0.0001
Type 2 diabetes	—	27	16	—	—
Hypertension	—	29	18	—	—
Kidney failure	—	—	—	—	—
Hypercholesterolemia	3	42	23	<0.0001	<0.0001
Hypertriglyceridemia	1	34	12	<0.0001	<0.0001
Gamma-glutamyl transpeptidase (IU/L)	36.67 ± 19.03	36.83 ± 20.83	39.17 ± 14.57	n.s.	n.s.
Uric acid (mg/dL)	4.25 ± 2.27	3.15 ± 1.17	5.03 ± 1.36	n.s.	n.s.
aspartate aminotransferase (IU/L)	22.56 ± 7.16	35.41 ± 9.19	47.78 ± 11.02	<0.0001	<0.0001
alanine aminotransferase (IU/L)	19.94 ± 8.78	38.31 ± 7.18	49.63 ± 9.29	<0.0001	<0.0001

Tabella 1. Caratteristiche demografiche dei pazienti arruolati.

Dallio et al. AP&T, 2018.

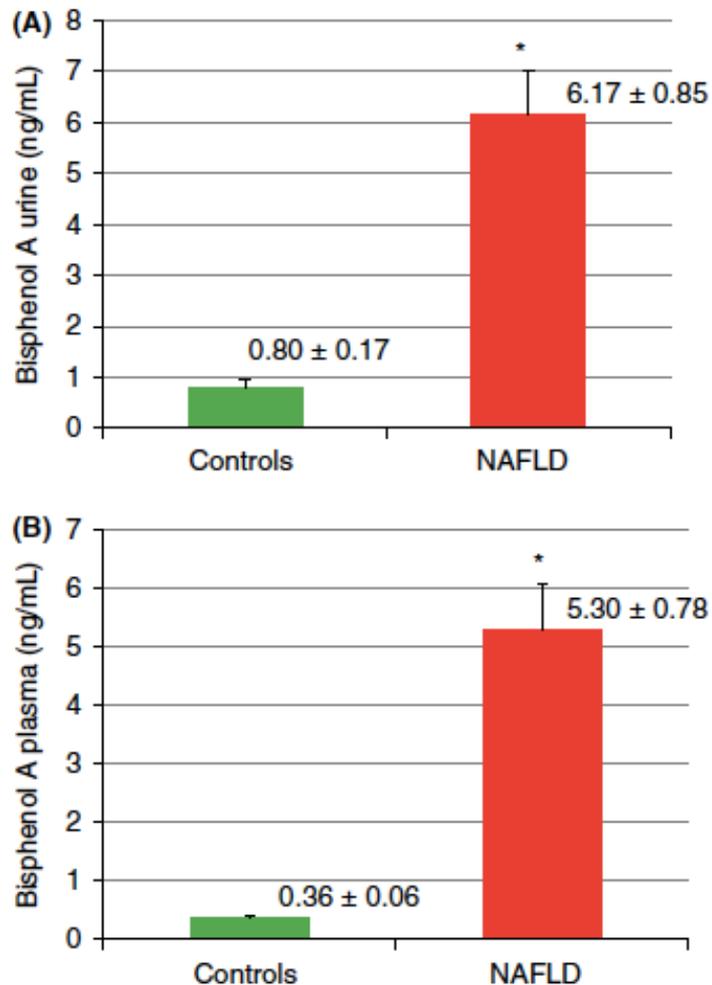


Figura 8. Livelli di BPA nelle urine (A) e nel plasma (B) in pazienti NAFLD (60) rispetto ai controlli (60) (* $p < 0.0001$ rispetto ai controlli). Il BPA è risultato significativamente più elevato nei pazienti NAFLD rispetto ai controlli, sia nelle urine (6.17 ± 0.85 ng/mL vs 0.80 ± 0.17 ng/mL rispettivamente; $p < 0.0001$) che nel plasma (5.30 ± 0.78 ng/mL vs 0.36 ± 0.06 ng/mL rispettivamente; $p < 0.0001$).

Dallio et al. AP&T, 2018

Abbiamo inoltre stratificato tale dato in rapporto alla presenza o meno di necroinfiammazione e fibrosi tissutale evidenziabile dall'analisi dei campioni istologici: pazienti NAFL (n. 30) e pazienti NASH (n. 30). Nessuno dei pazienti era affetto da fibrosi significativa o cirrosi e tutti i pazienti classificati come NASH che hanno ricevuto la diagnosi di NASH hanno mostrato un punteggio al naflD activity score superiore a 5. I livelli plasmatici di BPA sono risultati significativamente più

alti nei pazienti con NASH rispetto a quelli NAFL (rispettivamente 7.79 ± 2.34 ng/mL contro 4.40 ± 0.57 ng/mL; $p=0.041$), indipendentemente dalla presenza di DM2 (figura 9).

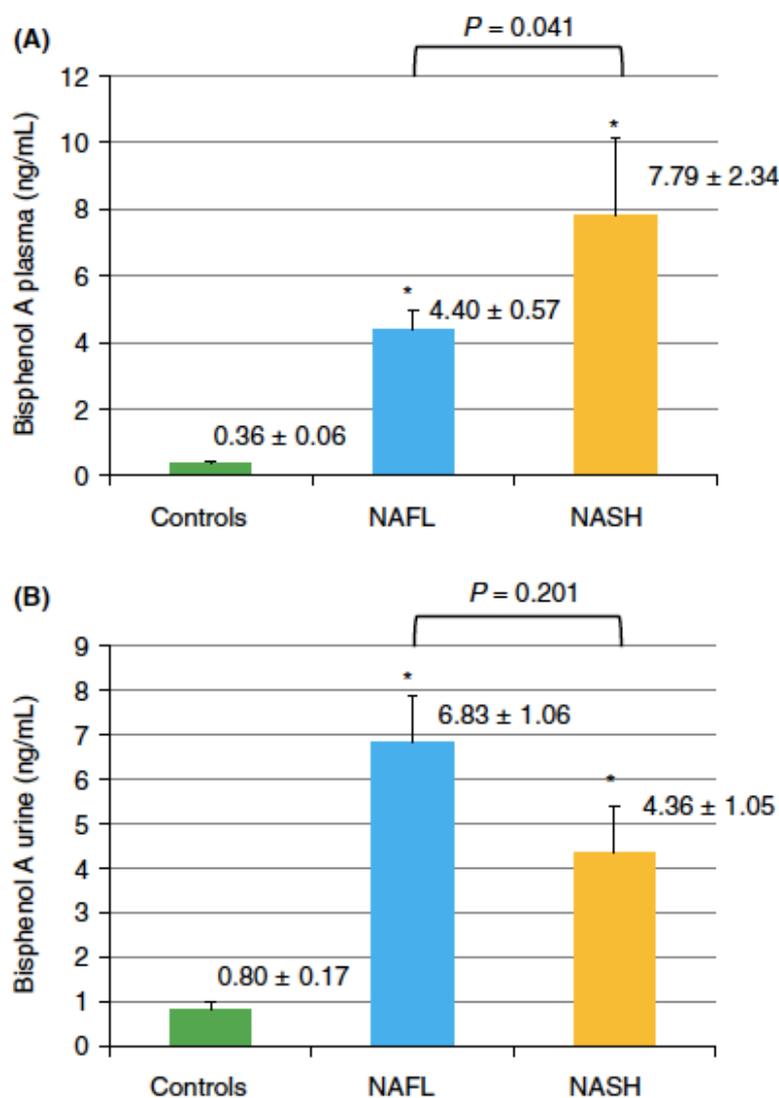


Figura 9. Livelli di BPA plasmatico (A) e urinario (B) in pazienti con NAFL (30) e pazienti con NASH (30) (* $p < 0.0001$ rispetto ai controlli, $p = 0.041$). I livelli di BPA plasmatico sono risultati significativamente più alti nei pazienti NASH rispetto ai NAFL (7.79 ± 2.34 ng/mL vs 4.40 ± 0.57 ng/mL rispettivamente; $p = 0.041$), indipendentemente dalla presenza o meno di diabete mellito di tipo 2. D'altra parte i livelli di BPA urinario sono risultati più bassi in pazienti NASH rispetto ai NAFL, anche se tale differenza non è risultata statisticamente significativa (4.36 ± 1.05 ng/mL vs 6.83 ± 1.06 ng/mL rispettivamente; $p = 0.201$).

Abbiamo inoltre identificato un'associazione significativa tra i livelli plasmatici di BPA e il grado di infiammazione tissutale valutato secondo Kleiner et al: 32 assente, basso, moderata, grave (figura 10).

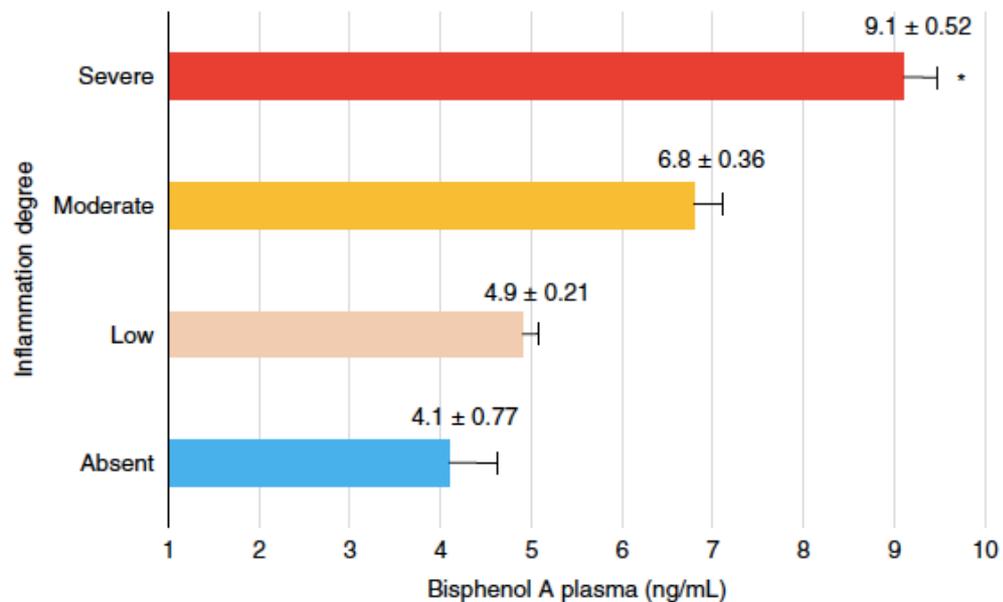


Figura 10. Correlazione tra i livelli plasmatici di BPA e la necroinfiammazione epatica in accordo con il sistema stadiativo Kleiner et al: assente, moderata, severa (* $p = 0.032$ grado severo rispetto ad assente).

Dallio et al. AP&T, 2018

Diversamente, i livelli urinari di BPA sono risultati inferiori nei pazienti NASH rispetto a quelli NAFL, sebbene questa differenza non fosse statisticamente significativa tra i due gruppi (4.36 ± 1.05 ng/mL contro 6.83 ± 1.06 ng/mL rispettivamente; $p=0.201$) (figura 9 B).

Tutti i pazienti con NAFLD hanno seguito una dieta BPA-free per 1 mese. L'effetto è stato una riduzione significativa del BPA circolante tra il primo e il secondo controllo ($5.30 \pm 0,78$ ng/mL contro 2.02 ± 0.58 ng/mL rispettivamente; $p=0.016$), ad eccezione di un paziente che ha mostrato

un aumento dei livelli plasmatici di BPA dopo la dieta (figura 11A). Tuttavia, dopo un'accurata raccolta della storia medica abbiamo appurato che il suddetto paziente non aveva perfettamente seguito la dieta come da indicazione. La riduzione dei livelli urinari di BPA dei pazienti con NAFLD dopo la dieta BPA-free non è stata statisticamente significativa (6.17 ± 0.85 ng/mL contro 5.83 ± 0.65 ng/mL rispettivamente; $p=0.221$) (figura 11B).

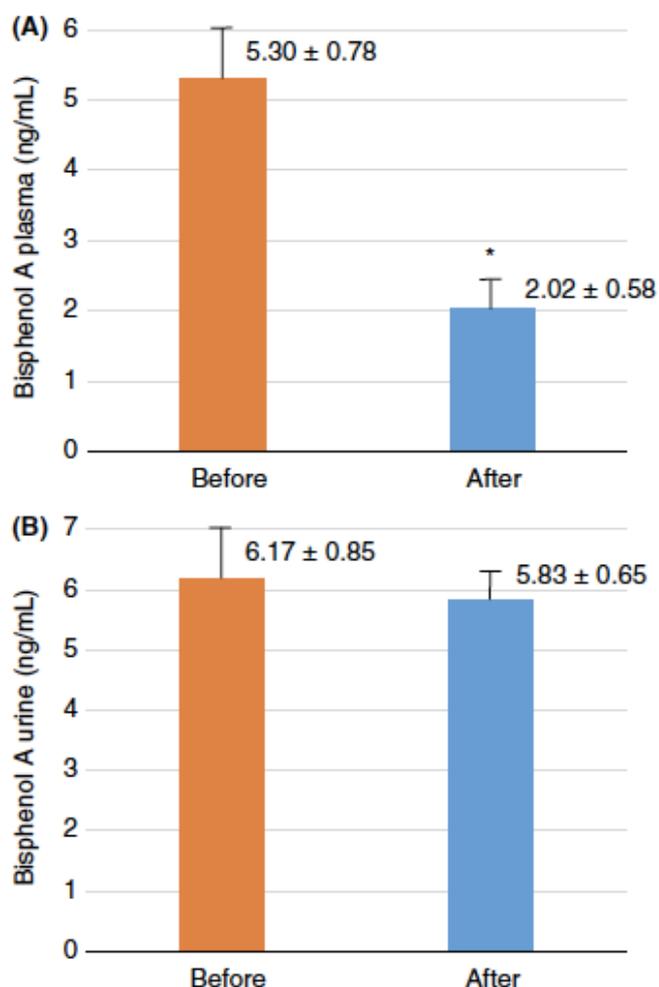


Figura 11. Livelli di BPA plasmatici (A) ed urinari (B) di pazienti NAFLD prima e dopo un mese di dieta BPA-free. Si è osservata una riduzione dei livelli di BPA circolanti (5.30 ± 0.78 ng/ mL vs 2.02 ± 0.58 ng/mL rispettivamente; $p = 0.016$). La riduzione dei livelli urinari di BPA non è stata statisticamente significativa (6.17 ± 0.85 ng/mL vs 5.83 ± 0.65 ng/mL rispettivamente; $p = 0.221$).

Dallio et al. AP&T, 2018

Il tasso di escrezione urinaria di BPA non ha mostrato una modifica statisticamente significativa prima e dopo la dieta BPA-free (rispettivamente 382 ± 2.27 ng/h contro 361 ± 3.12 ng/h; $p=0.324$). I test di laboratorio di routine non sono cambiati in modo statisticamente significativo dopo dieta BPA-free. Le variabili biochimiche valutate nello studio non si sono modificate dopo un mese di dieta BPA-free (tabella 2).

	Before bisphenol A-free diet	After bisphenol A-free diet	P-value
Fasting glucose (mg/dL)	108 ± 19	106 ± 20	n.s.
Insulin (ng/mol)	0.90 ± 0.37	0.87 ± 0.29	n.s.
Total cholesterol (mg/dL)	168 ± 59	172 ± 43	n.s.
High density lipoprotein (mg/dL)	37 ± 9	40 ± 7	n.s.
Triglycerides (mg/dL)	181 ± 49	187 ± 62	n.s.
Aspartate aminotransferase (IU/L)	43 ± 15	47 ± 13	n.s.
Alanine aminotransferase (IU/L)	47 ± 11	51 ± 9	n.s.
Gamma-glutamyltranspeptidase (IU/L)	29 ± 18	32 ± 8	n.s.

Tabella 2. Variabili biochimiche valutate prima e dopo un mese di dieta BPA-free. I parametri non si sono modificati in maniera statisticamente significativa ($p > 0.05$)

Dallio et al. AP&T, 2018

I pazienti con NAFLD hanno mostrato valori TBARS più elevati rispetto ai controlli ($p<0.01$). In particolare i pazienti NASH presentavano livelli di TBARS più elevati rispetto a quelli NAFL ma tale risultato non è stato statisticamente significativo ($p=0.104$). L'attività di SOD e CAT si sono mostrate maggiori nel gruppo NAFLD rispetto ai controlli ($p<0.01$) ma la differenza tra il gruppo NAFL e quello NASH non era statisticamente significativa ($p=0.081$). Dopo 1 mese di dieta BPA-free i pazienti NAFLD hanno mostrato una riduzione dei livelli di TBARS, SOD E CAT rispetto al baseline ma in modo non statisticamente significativo. In relazione alla valutazione nutrizionale, abbiamo osservato la stessa composizione qualitativa della dieta tra gruppo NAFLD e controlli in termini di percentuale di macronutrienti e micronutrienti assunti quotidianamente. Non è stata riscontrata significativa assunzione giornaliera di alcolici né per pazienti né controlli. Inoltre non

è stato riscontrato alcun cambiamento quantitativo/qualitativo nella composizione dietetica dei pazienti NAFLD durante e dopo dieta BPA-free. Questo regime dietetico è stato incentrato solo sull'evitare confezioni alimentari contenenti alti livelli di BPA come contenitori in plastica con simboli "3 e 7" sulla superficie.

4.5.b Studio in vitro: effetti del BPA su proliferazione e vitalità cellulare

Per valutare l'effetto diretto dell'esposizione al BPA è stato utilizzato il modello cellulare HepG2. Al fine di simulare stati iper od ipoglicemici in vitro, l'incubazione cellulare è stata fatta avvenire ad sia ad alte (H-HepG2) che a basse (L-HepG2) concentrazioni di glucosio.

H-HepG2 e L-HepG2 sono state esposte per 24, 48 e 72 ore al BPA a due diverse concentrazioni (0.025 e 0.05 uM). Abbiamo riscontrato un incremento della proliferazione cellulare indotto dal BPA in modo tempo e concentrazione dipendente solo in H-HepG2. A 24 ore, questo effetto è evidente ma non statisticamente significativo. Diversamente un aumento significativo della percentuale di proliferazione rispetto ai controlli è stato osservato a 48 h (sia a 0.025 che a 0.05 uM; $p < 0.0001$) e a 72 h (solo a 0.05 uM; $p < 0.05$) (figura 12). Abbiamo inoltre riscontrato un incremento statisticamente significativo dei TBARS nelle colture cellulari esposte al BPA, rispetto ai controlli ($p < 0.0001$) (figura 13).

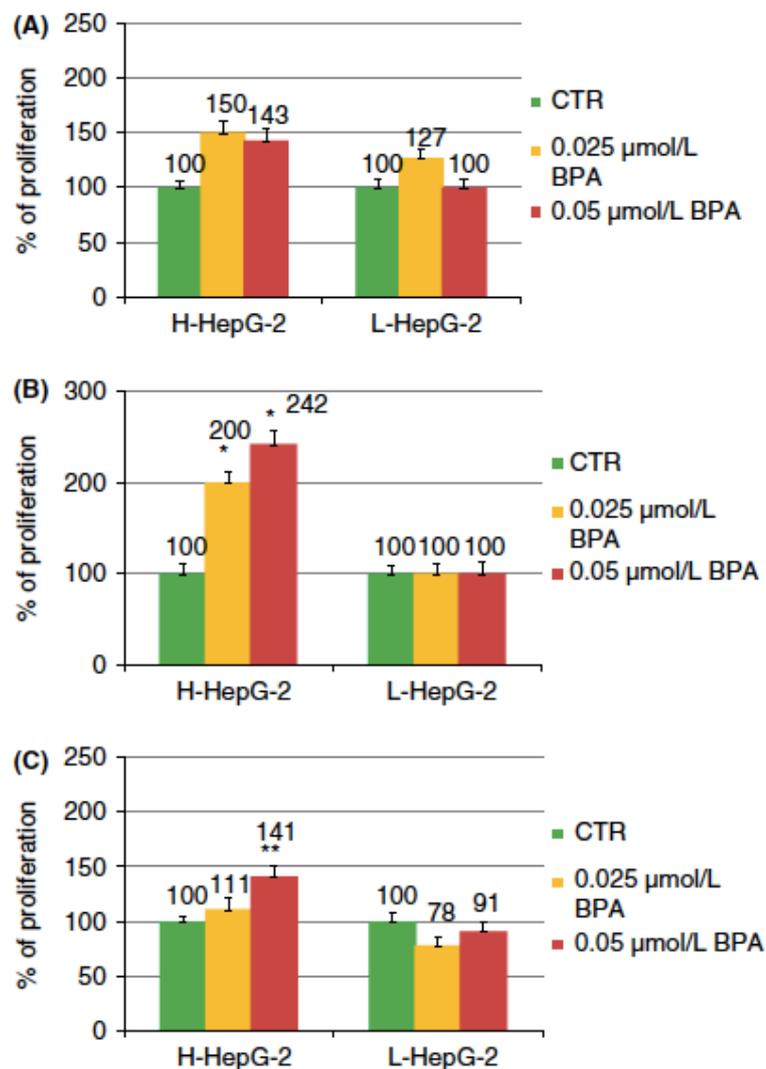


Figura 12. Effetti del BPA (0.025 e 0.05 uM) sulla vitalità cellulare valutata a 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) con saggio MTT (* $p < 0.0001$, ** $p < 0.05$ rispetto ai controlli). Il BPA ha indotto un incremento della proliferazione cellulare in modo tempo e concentrazione dipendente solo in H-HepG2. A 24 ore tale effetto è chiaramente evidente ma non in maniera statisticamente significativa, invece essa subisce un significativo incremento a 48 (sia a 0.025 che a 0.05 uM; $p < 0.0001$) che a 72 h (solo a 0.05 uM; $P < 0.05$).

Dallio et al. AP&T, 2018

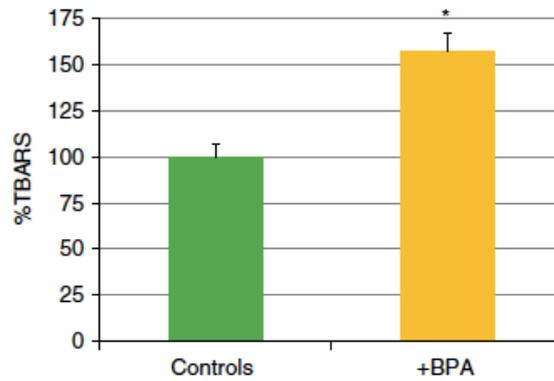


Figura 13. Valutazione dello stress ossidativo attraverso saggio TBARS su cellule HepG2 esposte al BPA (0.05 uM) per 48 h (*p < 0.0001 rispetto ai controlli). In H-HepG2 l'esposizione a BPA per 48 h induce un incremento di TBARS rispetto alle cellule non trattate (p < 0.0001). Tale evidenza sottolinea la capacità di BPA nell'indurre stress ossidativo e lipoperossidazione.

Dallio et al. AP&T, 2018

4.5.c Studio in vitro: effetto del BPA sull'accumulo lipidico intracellulare

Il metodo ORO è stato utilizzato per il rilevamento di lipidi intracellulari. La colorazione ORO al microscopio ha rivelato l'accumulo di goccioline lipidiche nel citoplasma delle cellule HepG2 dopo il trattamento con BPA alla concentrazione 0,05 uM per 72 ore.

Non sono stati registrati cambiamenti nelle cellule di controllo HepG2 incubate con acidi grassi ma non esposti al BPA (figura 14).

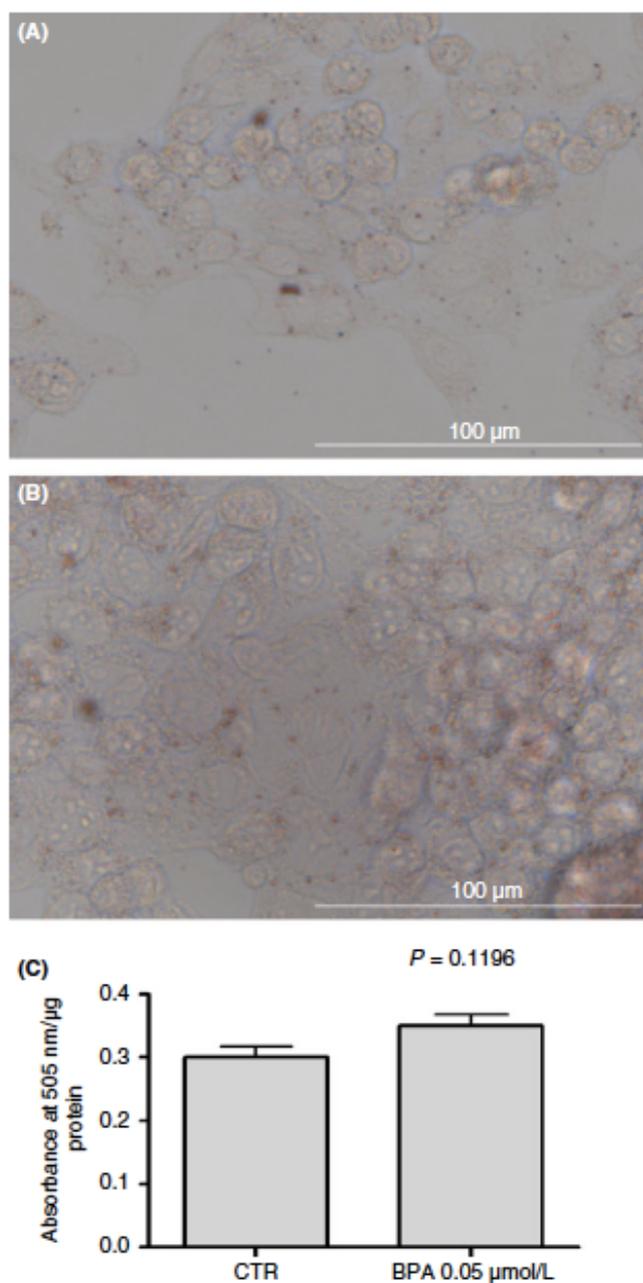


Figura 14. ORO staining Microscopy (pannello A e B) e ORO colorimetric assay (pannello C) eseguito su colture cellulari HepG2 esposte a BPA 0.05 uM per 72 h con acidi grassi (pannello B) paragonate a colture cellulari di controllo (pannello A). La metodica dimostra un accumulo di lipidi nel citoplasma delle cellule HepG2 dopo trattamento con BPA 0.05 uM per 72 ore.

Dallio et al. AP&T, 2018

4.6 Risultati coorte II

Le caratteristiche generali dei pazienti arruolati sono mostrate nella tabella 1. Rispetto alla popolazione di pazienti sani di controllo, i pazienti con NAFLD presentavano differenze statisticamente significative ($p < 0:05$) per quasi tutti i parametri valutati al basale: BMI, peso corporeo, AST, ALT, insulina, HOMA-IR, totale colesterolo, trigliceridi, vitamina D, CRP, TNF- α , EGFR, CD-44, IL-18, IGF-II, IL-22, TGF- β , MMP-2, Endocan, HMGB-1 e TBARS (Tabella 3). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per quanto riguarda l'apporto calorico giornaliero ed il tipo di calorie assunte tra i due gruppi di pazienti (trattati vs non trattati) (Tabella 4). Per di più, la ripetizione della valutazione nutrizionale ai tre tempi di osservazione previsti dallo studio (T0, T6 e T12) non ha rivelato cambiamenti significativi nelle abitudini alimentari per entrambi i gruppi. Per quanto riguarda i parametri clinici valutati (BMI, WHtR, peso e pressione sanguigna), non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi NAFLD e, all'interno di ciascun gruppo, tra i tre tempi di osservazione.

Variable	Healthy controls (no. 60)	NAFLD population (no. 90)	NAFLD treated patients (no. 60)	Not treated NAFLD patients (no. 30)
Age (y)	47 ± 15	54 ± 11	51 ± 6	47 ± 10
Sex (M/F)	30/30	48/42	29/31	19/11
Weight (kg)	71 ± 10.6	88.98 ± 15.08	80.61 ± 13.82	82.07 ± 11.54
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 3.9	32.38 ± 4.56	28.92 ± 6.65	29.43 ± 4.65
WHtR	0.81 ± 0.11	0.94 ± 0.06	0.91 ± 0.16	0.93 ± 0.08
Systolic blood pressure (mmHg)	120 ± 13	141 ± 14	138 ± 16	140 ± 9
Controlled attenuation parameters (dB/m)	168.25 ± 52.05	281.75 ± 60.05	282.65 ± 52.53	279.63 ± 58.76
AST (IU/l)	28 ± 11	44 ± 18	44 ± 9	43 ± 10
ALT (IU/l)	29 ± 14	47 ± 19	45 ± 14	48 ± 16
γGT (IU/l)	30 ± 13	36 ± 5	31 ± 17	39 ± 5
FPG (mg/dl)	72 ± 12	89 ± 26	87 ± 13	90 ± 11
Insulinemia (μU/ml)	12 ± 4	25 ± 8	24 ± 5	26 ± 3
HOMA-IR	0.9 ± 0.2	2.4 ± 0.6	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.4
TCH (mg/dl)	112 ± 30	142 ± 17	138 ± 27	146 ± 22
TG (mg/dl)	87 ± 13	87 ± 13	87 ± 13	87 ± 13
LDL (mg/dl)	89 ± 11	92 ± 9	95 ± 11	90 ± 16
Vitamin D (ng/ml)	88 ± 19	26 ± 15	23 ± 12	27 ± 9
CRP (μg/mg)	0.23 ± 0.02	1.89 ± 0.25	1.76 ± 0.32	2.01 ± 0.06
Ferritin (μg/l)	143 ± 34	156 ± 25	150 ± 32	158 ± 41
TNF-α (pg/ml)	12.7 ± 2.2	65.7 ± 22.6	63.5 ± 1.2	68.2 ± 1.8
EGFR (ng/ml)	10.6 ± 5	28.9 ± 2	27.3 ± 4.2	29.8 ± 5.3
CD-44 (ng/ml)	6.1 ± 1.8	12.9 ± 0.7	10.8 ± 0.9	13.3 ± 1
IL-18 (pg/ml)	70.1 ± 38.9	165.6 ± 26.7	159.8 ± 18.9	167.2 ± 22.8
IGF-II (pg/ml)	192.1 ± 43.6	265.9 ± 44.7	261.6 ± 34.6	266.9 ± 32.2
IL-22 (pg/ml)	19.3 ± 6.2	28.8 ± 7.6	29.3 ± 5.2	26.6 ± 4.8
TGF-β (pg/ml)	112.3 ± 42.3	188.8 ± 32.1	192.4 ± 41.1	184.2 ± 37.6
MMP-2 (ng/ml)	15.1 ± 3.7	27.4 ± 2.8	29.3 ± 2.3	25.7 ± 3.9
FIB-4	1.17 ± 0.21	1.27 ± 0.34	1.31 ± 0.18	1.24 ± 0.21
NFS	-1.145 ± 0.02	-1.149 ± 0.06	-1.152 ± 0.05	-1.138 ± 0.04
Stiffness (kPa)	3.4 ± 1.2	5.5 ± 2.6	5.9 ± 0.8	5.1 ± 1.1
Endocan (pg/ml)	372.8 ± 189.3	564.9 ± 196.7	572.3 ± 144.8	541.1 ± 178.9
HMGB-1 (pg/ml)	832.7 ± 242.2	1756.8 ± 212.8	1766.7 ± 282.8	1741.4 ± 142.6
TBARS (nmol/μg)	50.6 ± 24	194.6 ± 32	199.7 ± 27	191.6 ± 14

NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease; BMI: body mass index; WHtR: waist-to-height ratio; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; γGT: gamma glutamyl transpeptidase; FPG: fasting plasma glucose; HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance; TCH: total cholesterol; TG: triglycerides; LDL: low-density lipoprotein; CRP: C reactive protein; TNF-α: tumor necrosis factor-alpha; EGFR: epidermal growth factor receptor; CD-44: cluster of differentiation 44; IL-18: interleukin-18; IGF-II: insulin growth factor-II; IL-22: interleukin-22; TGF-β: transforming growth factor-beta; MMP-2: metalloproteinase-2; HMGB-1: high mobility group box-1; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

Tabella 3: caratteristiche demografiche della popolazione in studio (coorte II)

Federico et al, Oxid Med Cell Longev, 2019

Variable	Healthy controls (no. 60)	NAFLD population (no. 90)	NAFLD treated patients (no. 60)	Not treated NAFLD patients (no. 30)
Daily intake (kcal)	2116.5 ± 679.5	2746 ± 164	2667 ± 174	2765 ± 144
Total daily proteins (% of total energy intake)	23 ± 11.5	26.3 ± 2.9	24.3 ± 2.3	23.3 ± 5.4
Soluble carbohydrates (g/day)	89.5 ± 26.5	98.9 ± 13.4	89.3 ± 12.4	88.8 ± 16.5
Saturated fatty acids (% of total energy intake)	8 ± 3.95	10.5 ± 1.9	12.3 ± 1.2	12.4 ± 2.4
Monounsaturated fatty acids (% of total energy intake)	4.55 ± 1.3	14.5 ± 4.6	12.8 ± 3.5	13.2 ± 3.8
Polyunsaturated fatty acids (% of total energy intake)	22.5 ± 6.5	7.1 ± 4.2	7.5 ± 4.3	6.5 ± 4.1
Folic acid (µg per day)	342 ± 101.5	328.6 ± 134.5	332.6 ± 134.5	316.6 ± 134.5
Vitamin A (µg per day)	723 ± 199.5	881.4 ± 344.5	798.4 ± 284.3	898.5 ± 351.2
Vitamin C (µg per day)	118 ± 50.5	145.7 ± 49	145.7 ± 49	145.7 ± 42
Thiamine (µg per day)	0.9 ± 0.4	1.6 ± 0.7	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.5
Riboflavin (µg per day)	3.5 ± 2.5	2.6 ± 1.3	2.6 ± 1.3	2.6 ± 1.3
Vitamin B6 (µg per day)	2 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.5	1.3 ± 0.1

NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease.

Tabella 4: valutazione nutrizionale della popolazione in studio (coorte II).

Federico et al, Oxid Med Cell Longev, 2019

Sei mesi dopo il baseline, la percentuale di pazienti con NAFLD trattati che hanno manifestato un miglioramento statisticamente significativo di ALT e γ GT è stata maggiore rispetto ai pazienti con NAFLD non trattati ($p = 0:046$ e $p = 0:032$, rispettivamente). D'altra parte non è stato riscontrato cambiamento significativo di AST nei due gruppi di pazienti a sei mesi dal baseline (T6) ($p = 0:073$) (figura 15).

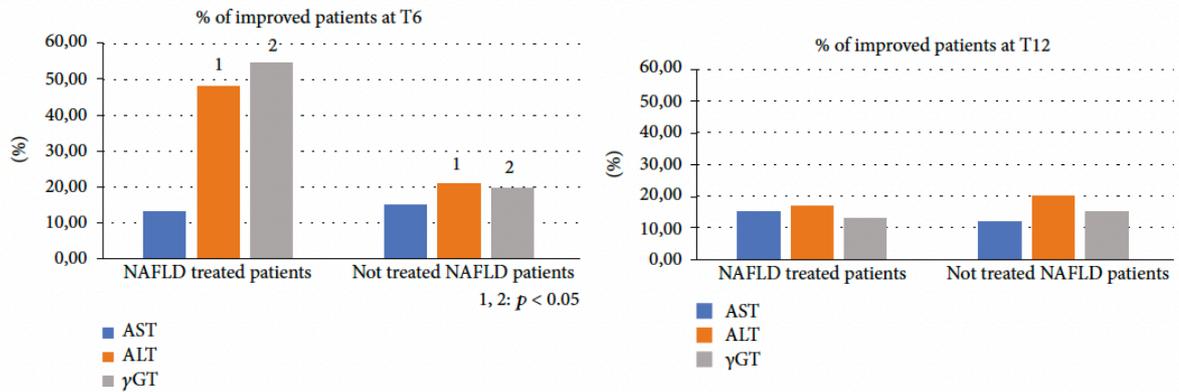


Figura 15: percentuale di pazienti con miglioramento statisticamente significativo di AST, ALT e GGT (coorte II).

Federico et al, Oxid Med Cell Longev, 2019

Alla fine del periodo di follow-up (T12), la proporzione di pazienti NAFLD trattati che hanno mostrato un miglioramento significativo di ALT e γ GT è stata significativamente ridotta, diventando simile a quella dei non trattati ($p = 0:143$; $p = 0:091$). AST non ha subito cambiamenti significativi al basale, T6 e T12 (Figura 15). Per quanto riguarda i parametri metabolici, la percentuale di pazienti che ha mostrato un miglioramento statisticamente significativo di insulina, HOMA-IR, vitamina D e grado di steatosi valutato al CAP a sei mesi dal basale è risultata maggiore nei pazienti trattati rispetto ai non trattati, anche se per quest'ultimo parametro non è stata riscontrata una normalizzazione completa ($p = 0:032$, $p = 0:044$, $p = 0:038$ e $p = 0:042$, rispettivamente) (Figura 16).

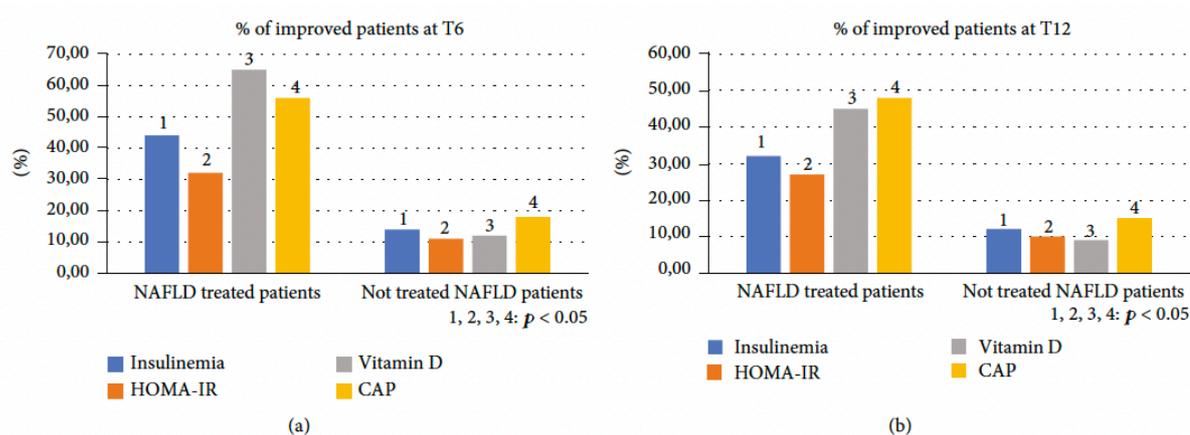


Figura 16: percentuale di pazienti con miglioramento statisticamente significativo di insulinemia, HOMA-IR e vitamina D and CAP (coorte II).

Federico et al, Oxid Med Cell Longev, 2019

Questa differenza è rimasta statisticamente significativa al T12 ($p = 0:041$, $p = 0:043$, $p = 0:033$ e $p = 0:048$, rispettivamente) (Figura 16). Per quanto riguarda glicemia, colesterolo totale, trigliceridi e LDL, non ci sono stati cambiamenti significativi alle tre osservazioni temporali per entrambi i gruppi di studio. Tra i parametri di infiammazione sistemica, la percentuale di pazienti migliorati a T6 rispetto al basale è risultata maggiore nel gruppo trattato rispetto ai non trattati per quanto riguarda CRP e TNF- α ($p = 0:03$ e $p = 0:037$, rispettivamente) (Figura 17). Questi parametri nel gruppo trattato sono diventati simili a quelli dei pazienti non trattati a T12 ($p = 0:112$ e $p = 0:657$, rispettivamente) (Figura 17). Non ci sono stati cambiamenti significativi della ferritina ai tre tempi di osservazione per entrambi i gruppi di studio.

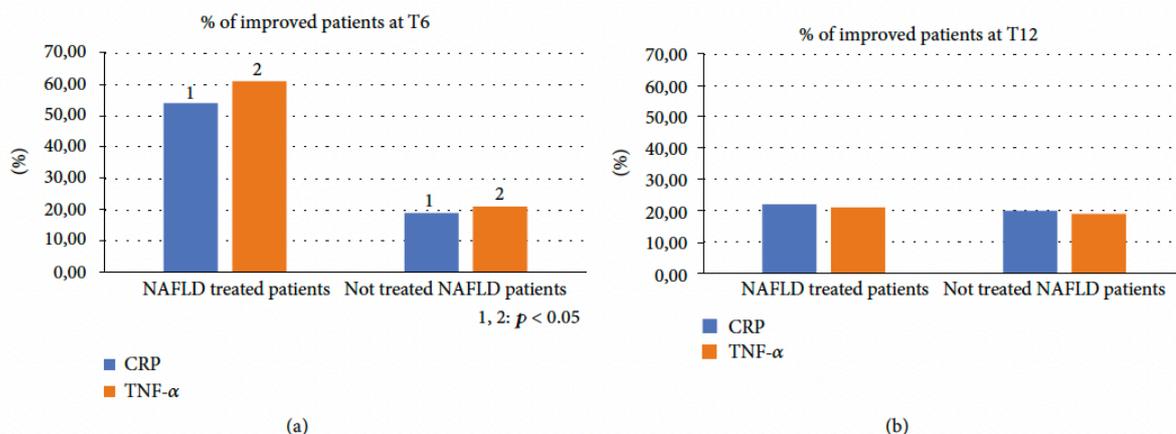


Figura 17: percentuale di pazienti con miglioramento statisticamente significativo di CRP e TNF- α (coorte II).

Federico et al, Oxid Med Cell Longev, 2019

Tra i marker di peggioramento/progressione di malattia, la proporzione di pazienti che ha mostrato un miglioramento significativo al T6 rispetto al basale di EGFR, IL-18, IGF-II, TGF- β e MMP-2 è stata maggiore nei pazienti trattati rispetto a quelli non trattati ($p = 0:044$, $p = 0:041$, $p = 0:032$, $p = 0:033$, e $p = 0:021$, rispettivamente) (Figura 18). Al T12, questo dato è stato confermato ($p = 0:046$, $p = 0:039$, $p = 0:042$, $p = 0:043$ e $p = 0:036$, rispettivamente) (Figura 18). Al contrario, non sono state riscontrate variazioni significative ai tre tempi di osservazione per CD-44, IL-22, FIB-4, NFS e stiffness nei due gruppi di pazienti. Infine, la proporzione di pazienti che hanno mostrato a T6 rispetto al baseline un miglioramento significativo di Endocan, HMGB-1 e TBARS è stata maggiore nel gruppo di pazienti trattati rispetto ai controlli ($p = 0:045$, $p = 0:043$ e $p = 0:031$) (Figura 19). A T12, la percentuale di pazienti con miglioramento di questi parametri è tornata ad essere simile nei due gruppi di studio ($p = 0:14$, $p = 0:082$ e $p = 0:091$) (Figura 19).

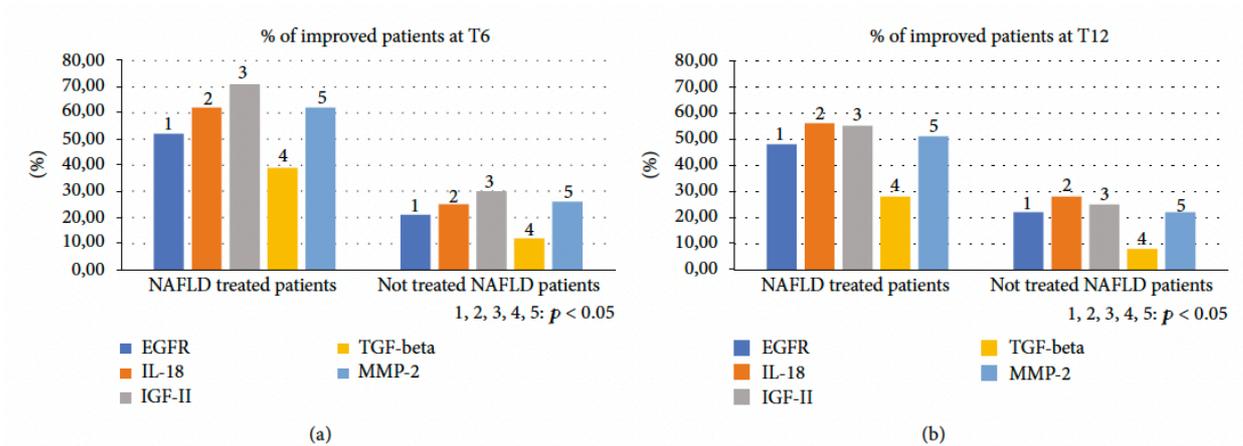


Figura 18: percentuale di pazienti con miglioramento statisticamente significativo di EGFR, IL-18, IGF-II, TGF-beta e MMP-2 (coorte II).

Federico et al, Oxid Med Cell Longev, 2019

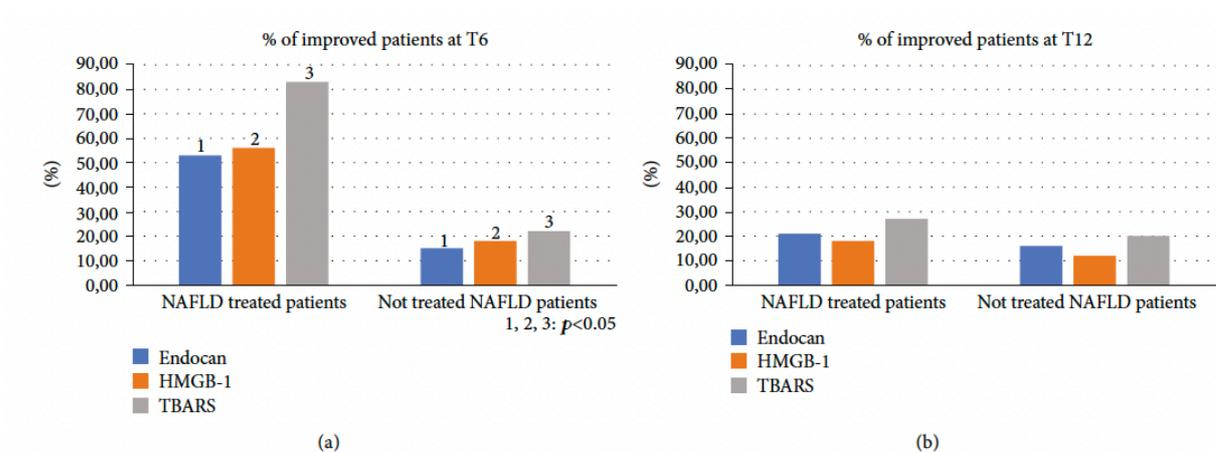


Figura 19: percentuale di pazienti con miglioramento statisticamente significativo di Endocan, HMGB-1 e TBARS (coorte II).

Federico et al, Oxid Med Cell Longev, 2019

Sedici pazienti su 30 (53,3%) non trattati hanno mostrato i criteri per la diagnosi di sindrome metabolica (SM). Tra questi, 14/16 (87,5%) presentavano un'istologia compatibile con la diagnosi di NASH, con valori di NAFLD activity score (NAS) ≥ 6 . Nessuno dei pazienti arruolati in questo

gruppo ha mostrato una fibrosi F4 in accordo con la stadiazione Metavir. 31/60 (51,6%) pazienti nel gruppo NAFLD trattato ha presentato i criteri per la diagnosi di SM. Tra questi, 30/31 (97%) presentavano un'istologia compatibile per NASH, con valori NAS ≥ 6 . Relativamente alla stadiazione istologica della fibrosi, solo uno dei pazienti arruolati è stato classificato come F4. Nella popolazione NASH con SM, stadi di fibrosi più elevati sono stati riscontrati rispetto a pazienti con steatosi semplice (Figura 20). Analizzando il sottoinsieme di pazienti con sindrome metabolica (47/90 pazienti della popolazione dello studio, 16/30 non trattati; 31/60 trattati), abbiamo osservato proporzioni più elevate di pazienti con parametri migliorati al T6 rispetto al basale nel gruppo dei pazienti trattati rispetto al gruppo non trattato relativamente ai seguenti parametri: insulinemia, HOMA-IR, vitamina D, PCR, TNF- α , TGF- β , Endocan, HMGB-1 e TBARS ($p < 0:001$) (Figura 21). Questa osservazione è rimasta statisticamente significativa anche a T12 ($p < 0:001$) (Figura 21).

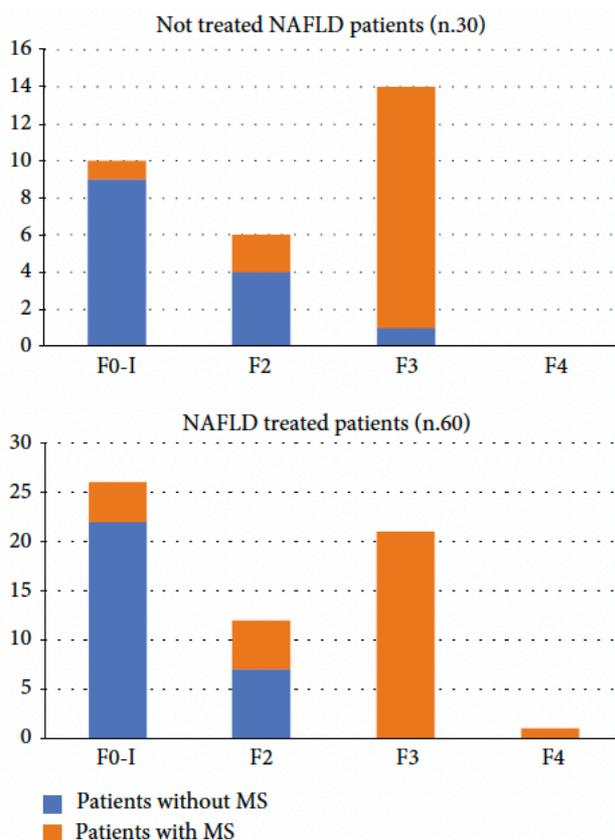


Figura 20: distribuzione di pazienti con diagnosi di sindrome metabolica e stadiazione della malattia epatica nei due gruppi di studio (coorte II).

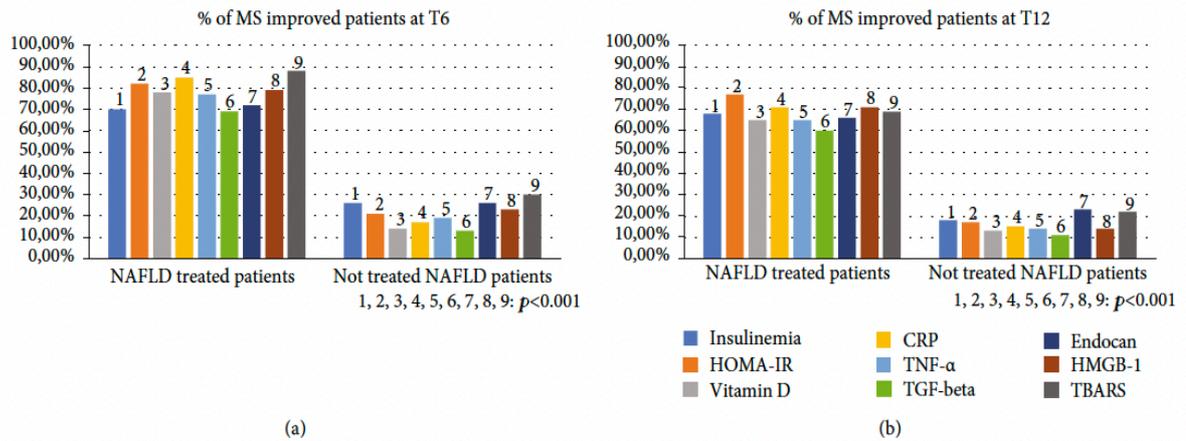


Figura 21: percentuale di pazienti con miglioramento statisticamente significativo di insulinemia, HOMA-IR, Vitamina D, proteina C reattiva, TNF-alpha, TGF-beta, Endocan, HMGB-1, TBARS (coorte II).

4.7 Risultati subanalisi pazienti non responder

4.7.a Abitudini alimentari, esercizio fisico e confronto al baseline tra i gruppi di studio

Nessuno dei pazienti arruolati ha mostrato un'alterazione della valutazione AUDIT C sia al basale che alla fine del trattamento. Inoltre, nessuno di loro ha svolto regolarmente esercizio fisico negli ultimi 2 anni prima dell'arruolamento né ha modificato l'attività fisica durante il periodo di studio. Non sono state riscontrate differenze significative tra i tre studi gruppi in merito l'apporto nutrizionale giornaliero al basale e alla fine del trattamento (Tabella 5).

Variables (M ± SD)	NAFLD wild type control group (n. 30)			NAFLD wild type treated group (n. 30)			NAFLD mutated treated group (n. 32)			p-value of the baseline comparison among the groups
	Baseline	End of treatment	p	Baseline	End of treatment	p	Baseline	End of treatment	p	
FPG (mg/dl)	99.7 ± 11.7	101 ± 14	0.503	100.3 ± 24.5	89.7 ± 18.5	0.0009	110.9 ± 24	110.9 ± 26.3	0.721	Mutated vs. WT treated: 0.464 Mutated vs. WT control: 0.455 WT treated vs. WT control: >0.999
Insulinemia (μU/ml)	25 ± 9	25.2 ± 9	0.464	25.7 ± 8.8	19.4 ± 9	0.006	26.4 ± 6.2	25.2 ± 6.8	0.447	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: 0.505 WT treated vs. WT control: >0.999
HOMA-IR	6.15 ± 2.38	6.33 ± 2.71	0.545	6.59 ± 3.26	4.51 ± 3.13	0.0001	7.35 ± 2.91	7.16 ± 3.46	0.742	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: 0.258 WT treated vs. WT control: >0.94
GGT (IU/L)	52 ± 50	58 ± 61	0.161	59 ± 31	57 ± 30	0.281	63 ± 77	64 ± 68	0.657	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
AST (IU/L)	31 ± 13	29 ± 16	0.322	34 ± 20	34 ± 14	0.45	39 ± 34	34 ± 31	0.571	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
ALT (IU/L)	54 ± 28	56 ± 37	0.81	57 ± 28	34 ± 14	<0.0001	68 ± 32	68 ± 43	0.674	Mutated vs. WT treated: 0.69 Mutated vs. WT control: 0.232 WT treated vs. WT control: >0.999
CRP (mg/dl)	3.26 ± 2.04	3.46 ± 2.36	0.703	3.72 ± 2.67	2.1 ± 2.37	0.0005	4.38 ± 2.28	4.04 ± 2.51	0.814	Mutated vs. WT treated: 0.144 Mutated vs. WT control: 0.041 WT treated vs. WT control: >0.999
TBARS (nmol/μg)	21.12 ± 23.35	23.81 ± 23.01	0.001	22.75 ± 25.91	10.31 ± 8.83	0.002	24.62 ± 15.15	23.25 ± 18.39	0.462	Mutated vs. WT treated: 0.2 Mutated vs. WT control: 0.1 WT treated vs. WT control: >0.999

Tabella 5: Valutazione intake nutrizionale al baseline e termine di trattamento per i tre gruppi di studio. Subanalisi pazienti non responder.

Dallio et al, *Frontiers in Medicine*, 2021

Sei pazienti affetti da diabete mellito sono stati arruolati nel gruppo di controllo di tipo NAFLD wild type, 9 nel gruppo NAFLD wild type trattati e 7 in quello NAFLD mutati trattati. Nessuno di loro assumeva insulina per il trattamento del diabete. Solo due di loro arruolati nel gruppo di controllo NAFLD wild type e tre rispettivamente negli altri due gruppi di studio assumevano metformina. Tra i gruppi di studio abbiamo arruolato 35 pazienti affetti da ipertensione arteriosa trattati con ACE-inibitori, calcioantagonisti o beta bloccanti non selettivi: 13 nel gruppo di controllo di tipo NAFLD wild type, 8 nel NAFLD wild type trattato e 14 NAFLD mutato sottoposto a trattamento. Due dei pazienti arruolati, entrambi nel gruppo NAFLD wild type trattato, erano affetti da fibrillazione atriale parossistica trattata con warfarin. Le caratteristiche al baseline della popolazione in studio sono riassunte nella tabella 6.

Variables (M ± SD)	NAFLD wild type control group (n. 30)			NAFLD wild type treated group (n. 30)			NAFLD mutated treated group (n. 32)			p-value of the baseline comparison among the groups
	Baseline	End of treatment	p	Baseline	End of treatment	p	Baseline	End of treatment	p	
Age (y)	47.9 ± 14.2	/	/	45.2 ± 15	/	/	47.1 ± 13	/	/	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
Sex (M/F)	15/15	/	/	13/17	/	/	18/14	/	/	0.597
BMI (kg/m ²)	28.1 ± 2.7	28.1 ± 2.7	0.827	29.09 ± 3.1	29.06.8 ± 3.1	0.871	30.5 ± 4.1	31.6 ± 3.6	0.062	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: 0.108 WT treated vs. WT control: 0.694
WHtR	0.9 ± 0.13	0.91 ± 0.12	0.112	0.96 ± 0.13	0.95 ± 0.12	0.679	1.08 ± 0.25	1.08 ± 0.26	0.372	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: 0.005 WT treated vs. WT control: 0.274
Metavir	1.4 ± 0.56	/	/	1.46 ± 0.57	/	/	1.46 ± 0.67	/	/	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
NAFLD activity score	5.36 ± 1.21	/	/	5.46 ± 1.27	/	/	5.93 ± 1.16	/	/	Mutated vs. WT treated: 0.51 Mutated vs. WT control: 0.2 WT treated vs. WT control: >0.999
CAP (dB/m)	271.9 ± 35.8	272.8 ± 36.8	0.373	271.5 ± 51.4	263.9 ± 43.6	0.251	316.7 ± 35.7	305.4 ± 43.4	0.136	Mutated vs. WT treated: 0.0002 Mutated vs. WT control: 0.0002 WT treated vs. WT control: >0.999
Stiffness (kPa)	4.7 ± 1.5	4.9 ± 1.2	0.117	4.3 ± 0.7	4.4 ± 0.7	0.568	4.8 ± 1.5	4.7 ± 1.7	0.893	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
SBP (mmHg)	126 ± 14	126 ± 11	0.664	126 ± 13	127 ± 11	0.436	129 ± 15	130 ± 11	0.299	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
DBP (mmHg)	74 ± 7	73 ± 5	0.243	75 ± 8	75 ± 7	0.279	76 ± 9	77 ± 8	0.492	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: 0.811 WT treated vs. WT control: >0.999

Variables (M ± SD)	NAFLD wild type control group (n. 30)			NAFLD wild type treated group (n. 30)			NAFLD mutated treated group (n. 32)			p-value of the baseline comparison among the groups
	Baseline	End of treatment	p	Baseline	End of treatment	p	Baseline	End of treatment	p	
FPG (mg/dl)	99.7 ± 11.7	101 ± 14	0.503	100.3 ± 24.5	89.7 ± 18.5	0.0009	110.9 ± 24	110.9 ± 26.3	0.721	Mutated vs. WT treated: 0.464 Mutated vs. WT control: 0.455 WT treated vs. WT control: >0.999
Insulinemia (μU/ml)	25 ± 9	25.2 ± 9	0.464	25.7 ± 8.8	19.4 ± 9	0.006	26.4 ± 6.2	25.2 ± 6.8	0.447	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: 0.505 WT treated vs. WT control: >0.999
HOMA-IR	6.15 ± 2.38	6.33 ± 2.71	0.545	6.59 ± 3.26	4.51 ± 3.13	0.0001	7.35 ± 2.91	7.16 ± 3.46	0.742	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: 0.258 WT treated vs. WT control: >0.94
GGT (IU/L)	52 ± 50	58 ± 61	0.161	59 ± 31	57 ± 30	0.281	63 ± 77	64 ± 68	0.657	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
AST (IU/L)	31 ± 13	29 ± 16	0.322	34 ± 20	34 ± 14	0.45	39 ± 34	34 ± 31	0.571	Mutated vs. WT treated: >0.999 Mutated vs. WT control: >0.999 WT treated vs. WT control: >0.999
ALT (IU/L)	54 ± 28	56 ± 37	0.81	57 ± 28	34 ± 14	<0.0001	68 ± 32	68 ± 43	0.674	Mutated vs. WT treated: 0.68 Mutated vs. WT control: 0.232 WT treated vs. WT control: >0.999
CRP (mg/dl)	3.26 ± 2.04	3.46 ± 2.36	0.703	3.72 ± 2.67	2.1 ± 2.37	0.0005	4.38 ± 2.28	4.04 ± 2.51	0.814	Mutated vs. WT treated: 0.144 Mutated vs. WT control: 0.041 WT treated vs. WT control: >0.999
TBARS (nmol/μg)	21.12 ± 23.35	23.81 ± 23.01	0.001	22.75 ± 25.91	10.31 ± 8.83	0.002	24.62 ± 15.15	23.25 ± 18.39	0.462	Mutated vs. WT treated: 0.2 Mutated vs. WT control: 0.1 WT treated vs. WT control: >0.999

Tabella 6: Valutazione demografica e dei parametri di studio al baseline e termine di trattamento per i tre gruppi di studio. Subanalisi pazienti non responder.

Dallio et al, Frontiers in Medicine, 2021

Come notato, abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi di studio per quanto riguarda WHtR, più alto in NAFLD mutati trattati rispetto ai controlli NAFLD wild type ($p = 0,005$) CAP, maggiore nei soggetti NAFLD mutati trattati rispetto ai controlli NAFLD wild type e wild type NAFLD trattati ($p = 0,0002$ per entrambi), CRP, maggiore nel

gruppo NAFLD mutato trattato rispetto al gruppo wild type NAFLD di controllo ($p = 0,045$).

4.7.b Risultato terapeutico

Analizzando l'esito terapeutico ottenuto a 6 mesi di somministrazione orale di 303 mg di complesso silibina-fosfolipide, 10 μ g di vitamina D e 15 mg di vitamina E due volte al giorno abbiamo riscontrato diverse differenze tra i gruppi. Quello wild type trattato ha dimostrato un miglioramento significativo, rispetto al baseline, di diversi parametri valutati alla fine del il trattamento: FPG, insulinemia, HOMA-IR, ALT, CRP, TBARS ($p = 0,0009, 0,006, 0,0001, <0,0001, 0,0005, 0,002$, rispettivamente). Diversamente il gruppo di controllo NAFLD wild type ha mostrato un peggioramento statisticamente significativo dei livelli di TBARS alla fine del trattamento rispetto al basale ($p = 0,001$), mentre il quello mutato non ha mostrato alcuna variazione statisticamente significativa di tutte le variabili valutate (Tabella 6). I modelli di regressione logistica multipla hanno mostrato che i pazienti NAFLD wild type trattati sono stati caratterizzati da maggiori possibilità di outcome terapeutico utile su insulinemia (RR: 6.876, 95% CI: 1.748–27,042, $p = 0,006$), HOMA-IR (RR: 11,341, IC 95%: 2,687–47,857, $p = 0,001$), ALT (RR: 7,198, IC 95%: 1,755-29,530, $p = 0,006$), PCR (RR: 12,254, IC 95%: 2,627–57,166, $p = 0,001$) e TBARS (RR: 6,912, 95% CI: 1,693-28,210, $p = 0,007$) rispetto ai pazienti portatori di almeno una delle mutazioni di cui sopra.

4.8 Discussione

4.8.a Coorte I

Studi recenti hanno dimostrato che l'esposizione a specifici inquinanti ambientali, appartenenti alla classe di interferenti endocrini è associata ad un aumento del rischio di malattie metaboliche come obesità, DM2, dislipidemia (121-125). Basse dosi di BPA sarebbero anche in grado di indurre l'accumulo di goccioline lipidiche e disfunzione mitocondriale epatocitaria inducendo il rilascio di ROS e citochine pro-infiammatorie (126). Alla luce di queste considerazioni, i nostri risultati hanno fornito alcuni importanti spunti di discussione. In primis abbiamo riscontrato maggiori livelli di BPA plasmatico ed urinario in pazienti NAFLD rispetto ai controlli. Questa evidenza scientifica rivolge l'attenzione al fatto che i pazienti NAFLD mostrano un'importante esposizione al BPA ambientale rispetto ai controlli. Questi dati sono conformi alla diversa composizione quantitativa della dieta del paziente NAFLD come desunto dall'analisi WinFood. Inoltre questi ultimi hanno mostrato una percentuale maggiore di grasso corporeo valutata mediante analisi di bioimpedenza, risultando, come conseguenza, un possibile aumento dell'accumulo di BPA nel tessuto adiposo, data la particolare lipofilia del composto in analisi. In particolare, nel nostro studio la popolazione dei pazienti con NASH rispetto a quelli NAFL ha mostrato una maggiore percentuale corporea di massa grassa. Dopo l'ingestione, il bisfenolo A viene metabolizzato nel fegato nella sua forma inattiva, BPA-glucuronato ed escreto nelle urine, con emivita da 4 a 43 ore. Tuttavia, diversi studi hanno evidenziato la possibilità di bioaccumulo nel tessuto adiposo e altri compartimenti fisiologici a causa della sua lipofilia (127). A sua volta, il rilascio di BPA dal tessuto adiposo può rappresentare una fonte di esposizione continua per organi bersaglio che li espone ad un'elevata possibilità di sviluppare un danno. Questa conclusione ci porta a considerare i livelli urinari di BPA come un marcatore dei livelli di assunzione quotidiani, mentre quelli circolanti riflettono la reale esposizione degli organi bersaglio (128). La maggior parte del BPA viene escreto nelle urine, a causa del suo rapido di metabolismo epatico ed escrezione (129-131). I nostri dati mostrano un aumento più marcato dei livelli circolanti di BPA in pazienti NASH rispetto a quelli con NAFL. Inoltre abbiamo riscontrato

un'associazione statisticamente significativa tra i livelli plasmatici di BPA e il quadro istologico, relativamente alla presenza di infiammazione tissutale associata al riscontro di “lobular inflammation e ballooning”. Un altro importante risultato della nostra ricerca è che i livelli plasmatici di BPA hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa nei pazienti dopo aver seguito la dieta BPA-free. Questa evidenza ha dimostrato che il BPA rappresenterebbe un fattore di danno ambientale potenzialmente eradicabile attraverso un semplice approccio dietetico. D'altra parte, l'aumento dei livelli urinari, sebbene presente, non è stato statisticamente significativo, in particolare nei pazienti con NASH. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che la principale via di escrezione del BPA è l'emuntorio urinario. Per questo i livelli di BPA sono rimasti elevati anche dopo dieta BPA-free, a causa del suo rilascio continuo da parte del tessuto adiposo. In conformità con le nostre osservazioni, non esiste una reale variazione del tasso di escrezione del BPA prima e dopo dieta BPA-free. I parametri biochimici valutati prima e dopo dieta BPA-free non hanno mostrato variazioni statisticamente significative. Tale osservazione non dovrebbe risultare sorprendente dato il fatto che un tempo di osservazione così breve non avrebbe potuto portare ad un loro miglioramento. Dopo un mese di dieta BPA-free i pazienti NAFLD hanno mostrato una riduzione dei livelli di TBARS circolanti, delle attività di SOD e CAT rispetto a T0 ma in maniera non statisticamente significativa. Questa osservazione potrebbe derivare da due ragioni: in primis i fattori scatenanti l'infiammazione e lo stress ossidativo nel paziente NAFLD sono molteplici e quindi non è strano che la sola eliminazione di BPA determini solo una riduzione parziale dei marcatori di stress ossidativo; in secondo luogo l'assenza di dati statisticamente significativi potrebbe derivare dal fatto che un mese di dieta non sarebbe in grado di eliminare completamente il quantitativo di BPA accumulatosi nel tessuto adiposo. Per quanto riguarda lo studio in vitro, nella nostra linea cellulare HepG2, il BPA ha indotto proliferazione cellulare e aumento significativamente lo stress ossidativo solo in H-HepG2 in maniera tempo e concentrazione dipendente. In particolare l'osservazione dell'induzione della proliferazione solo nelle cellule H-HepG2 potrebbe essere intesa come warning orientato a focalizzare l'attenzione del clinico su quel subset di popolazione NAFLD a maggior rischio di progressione patologica: i

pazienti affetti da concomitante DM2. Il BPA potrebbe svolgere un importante ruolo procancerogeno in questo contesto (132). Analogamente la l'esposizione al BPA ha indotto fenomeni di lipoperossidazione (uno dei principali meccanismi attraverso il quale si realizza il danno epatocellulare in NAFLD), valutata mediante quantizzazione dei TBARS. Tale evidenza, similmente, si è verificata solo in colture H-HepG2. Nel nostro studio sulla popolazione la distribuzione dei pazienti con DM2 era più elevata nel gruppo NASH rispetto al NAFL (25 e 2, rispettivamente), quindi, in questo scenario, potrebbe essere possibile ipotizzare che il BPA in questi soggetti funga da ulteriore fattore di progressione nella malattia di fegato indipendentemente dagli altri fattori di rischio di progressione tipici per il DM2. L'incubazione delle cellule HepG2 con acidi grassi e BPA alla concentrazione di 0,05 uM per 72h ha condotto inoltre ad un accumulo intracellulare di lipidi valutato mediante saggio ORO.

4.8.b Coorte II

Il preoccupante scenario clinico in cui la NAFLD tende a manifestarsi ha portato di recente ad un grande fervore scientifico orientato alla ricerca del più appropriato trattamento per questo tipo di pazienti (133). Nonostante molte molecole siano attualmente in corso di studio per la terapia a lungo termine della NAFLD, allo stato attuale non esiste alcun trattamento farmacologico approvato (134). Gli effetti benefici di prodotti a base di estratti naturali, in particolare silibina, sul fegato e sul metabolismo sistemico sono stati a lungo studiati da molti gruppi di ricerca. La silibina svolge attività antiossidante, insulino-sensibilizzante ed epatoprotettiva, oltre a manifestare un alto profilo di sicurezza per il trattamento a lungo termine (89). In uno studio multicentrico di fase III il nostro gruppo aveva già evidenziato come il trattamento per 12 mesi con il complesso fitosoma/silibina coformulato con vitamina E è stato in grado di indurre un miglioramento dei livelli ematici transaminasi, parametri di insulinoresistenza ed istologia epatica (102). Nell'analisi dei dati su questa seconda coorte di pazienti, esposti al BPA, abbiamo mostrato come i soggetti NAFLD abbiano differenze statisticamente significative al basale rispetto a una popolazione di soggetti epatologicamente sani per molti dei parametri presi in esame. In particolare, i pazienti con NAFLD hanno dimostrato maggiore BMI, peso corporeo, insulina, HOMA-IR, colesterolo totale,

trigliceridi, CRP, TNF- α , EGFR, CD-44, IL-18, IGF-II, IL-22, TGF- β , MMP-2, Endocan, HMGB-1, e TBARS, con l'evidenza, inoltre, di livelli medi inferiori di vitamina D. Questo quadro patologico rispecchia pienamente i dati presenti nella letteratura scientifica mostrando come i pazienti affetti da NAFLD siano più esposti a stress ossidativo, infiammazione sistemica e disfunzione endoteliale essendo caratterizzati, inoltre, da un livello ematico più elevato di citochine infiammatorie e marcatori di fibrosi rispetto a soggetti sani (135). Prendendo quindi in analisi la popolazione NAFLD randomizzata in due bracci: trattata (n. 60) e non trattata (n. 30), non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per quanto riguarda l'apporto calorico giornaliero e il tipo di calorie assunte giornalmente. Inoltre, le abitudini alimentari di tutti i soggetti arruolati non sono cambiate durante il periodo di studio in quanto non abbiamo raccomandato ai pazienti di adottare un diverso stile di vita rispetto a quello che avevano prima dell'arruolamento per non invalidare l'analisi dei risultati del nostro studio. Il gruppo di pazienti trattati con NAFLD rispetto ai pazienti con NAFLD non trattati ha mostrato una proporzione statisticamente maggiore di soggetti con normalizzazione dei seguenti parametri a sei mesi: ALT, γ GT, insulinemia, HOMA-IR e vitamina D, e CAP. Un'osservazione simile è stata messa in risalto per CRP, TNF- α , EGFR, IL-18, IGF-II, TGF- β , MMP-2, Endocan, HMGB-1 e TBARS. A T12, abbiamo osservato la perdita dell'effetto terapeutico indotto da silibina e registrato a T6 relativamente a ALT, γ GT, CRP, TNF- α , Endocan, HMGB-1 e TBARS. Diversamente, il vantaggio maturato durante i sei mesi di trattamento è stato mantenuto a T12 per insulinemia, HOMA-IR, vitamina D, CAP, EGFR, IL-18, IGF-II, TGF- β e MMP-2. Queste evidenze mostrano come l'uso di Realsil 100D per sei mesi sia riuscito, grazie al noto effetto antiossidante, antinfiammatorio e sensibilizzante insulinico della silibina, a rallentare il processo patologico agendo su molteplici target terapeutici. Ciò potrebbe significare che Realsil 100D sarebbe in grado non solo di rallentare la progressione del danno epatico ma anche migliorare la sensibilità dei tessuti periferici all'insulina, inibendo la formazione di radicali liberi e fungendo da scavenger per questi ultimi, riducendo la perossidazione lipidica e permeabilità della membrana mitocondriale. La sua attività sarebbe, inoltre, da ricondurre, su cellule stellate epatiche,

all'inibizione dell'attività della chinasi correlata al segnale extracellulare (ERK), MAP/ERK chinasi (MEK) e fosforilazione di Raf, riducendo la migrazione dei leucociti al sito di infiammazione e la sintesi indotta da TGF- β del procollagene di tipo I ed MMP-2 (136). Queste attività biologiche sono responsabili del controllo della cascata infiammatoria, la deposizione dell'accumulo di grasso negli epatociti e la riduzione della fibrogenesi epatica ed extraepatica. Un punto interessante è rappresentato dal fatto che il miglioramento dei marker di peggioramento della malattia come da valutazione sperimentale, viene mantenuto ben oltre la fine del periodo di trattamento. Quanto questa riduzione si traduca in un'efficace fibrolisi e/o lipolisi o la riduzione del rischio di sviluppo di HCC non è a tutt'oggi noto. Al contrario l'effetto antinfiammatorio ed antiossidante esercitato dalla silibina sembra molto più strettamente connesso alla sua somministrazione quotidiana, che comporterebbe la necessità di una somministrazione più lunga. Di grande importanza è anche l'effetto che la silibina esercita sull'omeostasi endoteliale. Sembra scientificamente dimostrato, infatti, che il paziente affetto da NAFLD, soprattutto in caso di presenza concomitante di SM, sia un paziente gravato da un elevato rischio cardiovascolare (137). La proporzione di pazienti trattati con NAFLD che hanno mostrato un netto miglioramento di Endocan e HMGB-1 rispetto a quelli non trattati è stata significativamente maggiore. Tuttavia, questa osservazione è stata annullata alla fine del periodo di follow-up, dimostrando, ancora una volta, una chiara dipendenza dalla somministrazione del farmaco. Nella popolazione affetta da concomitante sindrome metabolica, i risultati evidenziati sin'ora si sono ripetuti in maniera ancora più marcata, suggerendo che in questo subset di popolazione possa risiedere il prototipo specifico di paziente in grado di trarre il maggiore beneficio dall'assunzione di tale trattamento.

4.8.c Subanalisi pazienti non responder

In questo complesso scenario clinico, i GWAS hanno fatto luce sul ruolo di diverse varianti alleliche nello sviluppo e peggioramento della NAFLD (138). È anche ragionevole ipotizzare un effetto prodotto da queste varianti alleliche nella regolazione della risposta alla terapia in questo setting. Come notato, nel nostro attuale contesto clinico, solo il gruppo wild type trattato ha

mostrato un miglioramento statisticamente significativo di FPG, insulinemia, HOMA-IR, ALT, CRP, e TBARS; al contrario, il gruppo NAFLD wild type di controllo ha mostrato, dopo 6 mesi, un peggioramento di TBARS rispetto alla valutazione basale. L'analisi di regressione logistica ha confermato che, per tutti i parametri migliorati, il genotipo svolge un ruolo cruciale nell'ottenimento di un effetto terapeutico utile, indipendentemente da altre variabili confondenti: età, sesso, comorbidità, farmaci, rigidità epatica e CAP. È importante notare che per questa osservazione i nostri risultati hanno evidenziato la relativa indipendenza dallo specifico genotipo per la mancanza di effetto terapeutico. In altre parole, la presenza di almeno una delle suddette mutazioni è stata in grado di determinare la perdita di effetto terapeutico al regime prescritto. È stato evidenziato, in 154 adulti con NAFLD un coinvolgimento del PNPLA3 nella regolazione della risposta terapeutica a 30 minuti al giorno di esercizio fisico e regime alimentare tailored orientato a migliorare il consumo di frutta, verdura, prodotti a basso contenuto di grassi, a basso indice glicemico e ipocalorici, in accordo con le raccomandazioni dell'American Dietetic Association (139). I pazienti con NAFLD, in particolare i portatori di allele G, hanno dimostrato una maggiore riduzione del contenuto di trigliceridi intraepatici (GG: $11,3 \pm 8,8\%$) rispetto a quelli portatori dell'allele C (CC: $3,7 \pm 5,2\%$, CG: $6,5 \pm 3,6\%$) dopo 12 mesi di trattamento, insieme a un miglioramento del peso corporeo, WHtR, colesterolo totale e lipoproteine a bassa densità ma senza modifiche della stiffness. Questa osservazione sembra suggerire una possibile strategia per contrastare l'effetto dannoso dovuto alla predisposizione genetica di PNPLA3 alla NAFLD. D'altra parte, l'influenza genetica su l'esito della terapia farmacologica sembra essere diverso, o comunque non del tutto chiarito. Il "WELCOME trial" ha valutato la risposta alla somministrazione di un alto contenuto di omega-3 sul contenuto di grasso epatico e fibrosi in pazienti affetti da NAFLD (140). Alla fine del trattamento, quei pazienti portatori della variante 148I/I ed il genotipo 148I/M hanno mostrato una diminuzione della percentuale di grasso epatico (148I/I: $-7,05\%$, 148I/M: $-7,30\%$) mentre, al contrario, il gruppo 148M/M ha mostrato un moderato aumento ($2,75\%$). Attualmente la letteratura scientifica manca di dati riguardanti il coinvolgimento dei geni TM6SF2 e MBOAT7 sulla terapia

per NAFLD. Qui abbiamo evidenziato che indipendentemente dall'aver una, due o tre mutazioni, i pazienti risultano non responder ad un trattamento che invece ha dimostrato piena efficacia in caso di genotipo non mutato. Il principale coinvolgimento di questi geni nell'accumulo di grasso epatico potrebbe costituire la possibile spiegazione per l'associata insulino-resistenza che, a sua volta, rappresenta una delle cause ma anche l'effetto della steatosi epatica e peggioramento della fibrosi. La mancanza della risposta terapeutica potrebbe essere correlata all'impatto che queste varianti genetiche potrebbero avere nell'indurre appunto l'accumulo di grasso epatico, che a sua volta è responsabile del peggioramento del quadro clinico e, inoltre, potrebbe agire riducendo il potenziale effetto utile indotto dalla terapia descritta, la cui efficacia, alla luce dei risultati mostrati, potrebbe essere rivalutata in ampi studi randomizzati controllati considerando l'influenza genetica sull'interpretazione dei risultati. Il nostro studio ha il limite di non aver valutato il tasso di risposta specifica dividendo i pazienti in base al genotipo in omozigosi o eterozigosi così come l'effetto genotipo specifico per gene mutato. Tuttavia ciò non era stato previsto stato tra gli endpoint dello studio attuale perché che avrebbe richiesto una numerosità campionaria molto più ampia e di difficile raggiungimento. La prossima prospettiva futura potrebbe essere quella di aumentare la dimensione del campione in accordo con le specifiche mutazioni in omozigosi o eterozigosi, nonché procedere alla progettazione di un ampio studio clinico esplorando il possibile miglioramento istologico che potrebbe derivare dal regime terapeutico, randomizzando la popolazione in accordo con la genetica.

4.9 Conclusioni

I risultati del nostro studio evidenziano un possibile ruolo del BPA come fattore ambientale coinvolto nella progressione di NAFLD, in particolare nei pazienti con DM. Il BPA è un fattore ambientale con una distribuzione ubiquitaria. Questo prodotto chimico si trova in gran parte degli imballaggi alimentari, nell'acqua e in altre sostanze/oggetti ad uso quotidiano. Abbiamo dimostrato la maggiore esposizione al BPA dei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli. In particolare, i pazienti con NASH presentavano livelli più alti di BPA plasmatico rispetto a quelli con NAFL. Questi dati correlano anche con la maggiore percentuale di tessuto adiposo valutata alla bioimpedenziometria che condurrebbe ad un suo maggiore accumulo corporeo dato dalla elevata lipoaffinità. Inoltre, il BPA come fattore ambientale, essendo escreto attraverso le urine potrebbe essere considerato un fattore di progressione di malattia potenzialmente eliminabile grazie ad un regime dietetico BPA-free, tenendo presente, tuttavia, che un solo mese di tale dieta non è sufficiente ad assicurare la completa rimozione del quantitativo di deposito accumulatosi nel tempo. Tuttavia per produrre più forti evidenze scientifiche su tale punto di vista, probabilmente sarebbe necessario prolungare la dieta BPA-free per più di un mese. Infine abbiamo dimostrato, in vitro, l'effetto del BPA nell'induzione della proliferazione e della lipoperossidazione nelle cellule H-HepG2. L'osservazione di un aumento significativo del tasso di proliferazione di Hep-G2 e dei livelli di TBARS solo in terreno ad alta concentrazione di glucosio potrebbe essere spiegato considerando l'elevata quantità di glucosio come una fonte energetica in grado di sostenere la proliferazione cellulare e l'infiammazione. Tale assunto è stato confermato dall'analisi della via cellulare attivata da BPA in H-Hep-G2: proteina chinasi attivata dal mitogeno, fattore nucleare kappa B, aumento dell'espressione delle chinasi ciclina-dipendenti 4 e 6 che regolano la attività della proteina del retinoblastoma. L'obesità in questo quadro patologico deve essere considerata un cofattore offerente al BPA la possibilità di indurre un peggioramento di NAFLD, fungendo da "serbatoio lipidico" per il suo accumulo. Il ruolo specifico del BPA nello sviluppo di disfunzione metabolica del tessuto adiposo, obesità e NAFLD potrebbe rappresentare il futuro campo di ricerca nella letteratura scientifica in ambito epatologico. Inoltre, dall'analisi della coorte

Il esposta al BPA, la silibina si è dimostrata efficace nel controllo della manifestazione patologia a 360 gradi, essendosi, in tal senso, evidenziato anche un ruolo importante della genetica non solo nell'avanzamento patologico ma anche nella regolazione della risposta terapeutica. Tali risultati aprono la strada ad ulteriori ricerche su larghe popolazioni randomizzate in accordo alle caratteristiche genetiche al fine di poter meglio interpretare le reali possibilità terapeutiche dell'epatopatia del nuovo millennio.

Capitolo V

Trained Immunity e fegato

5.1 Introduzione

Con il progresso della medicina e l'avanzare delle conoscenze scientifiche l'ormai vecchia definizione per la quale il sistema immunitario reagirebbe ad un secondo contatto con antigeni (PAMPs o DAMPs) grazie ad una memoria immunologica esercitata esclusivamente dalle cellule dell'immunità adattiva è ormai stata sovvertita.

Con il termine "Trained Immunity" (TI) la comunità scientifica internazionale intende l'insieme dei processi immunologici, coinvolgenti cellule dell'immunità aspecifica, derivanti da un secondo contatto antigenico. Tale secondo contatto sarebbe in grado di produrre l'attivazione di pathway di segnale differenti, aventi effetti variabili sull'espressione genica e produttori, infine, una risposta fenotipica immunitaria più intensa rispetto a quella derivata dal primo contatto con l'antigene (141).

Le caratteristiche peculiari della TI sono:

- È un processo reversibile e transitorio: differentemente dall'adattamento immunitario che avviene nei linfociti B attraverso la produzione di cluster cellulari in grado di produrre specificatamente una risposta contro un determinato antigene per una modifica dell'assetto genetico cellulare a livello midollare. Questo tipo di adattamento è su base epigenetica. Come tale ha una durata variabile da pochi giorni fino a diversi anni e dipende in larga parte da una modifica nell'accessibilità all'espressione di alcuni geni dovuta ad una differente acetilazione degli istoni.
- È un processo trasmissibile alle nuove generazioni cellulari in maturazione midollare: il trapianto di cellule trained dal midollo di un topo immunizzato al midollo di un topo non immunizzato comporta l'acquisizione fenotipica dello stesso tipo di reazione immunitaria agli antigeni. Si ritiene che tale condizione sia dovuta alla regolazione sull'espressione genica operata da alcuni miRNA (es. miR-155) (142).

- Non è “antigene specifica”: una cellula divenuta trained per il contatto con un antigene è in grado di sviluppare una cros-reazione contro antigeni di altro tipo. Questo è il motivo per il quale il contatto con il Bacillus Calmette Guerin (BCG) comporta una reazione immunitaria contro antigeni tumorali come ad esempio nel caso del ca. vescicale.
- Le cellule più studiate in tal senso sono i monociti/macrofagi (sistemici e tissutali) e le cellule Natural Killer (143).
- I modelli sperimentali più spesso utilizzati fin’ora sono stati la stimolazione con LPS o beta glucano (143).
- Esiste un’associazione diretta tra il metabolismo cellulare e la risposta trained: la risposta infiammatoria (come ad esempio nel caso di macrofagi M1) è supportata da un metabolismo cellulare ad alta efficienza energetica, con il mantenimento dell’attività del ciclo di Krebs. Alcuni intermedi metabolici di tale ciclo come succinato o alfa ketoglutarato svolgono importanti ruoli come mediatori in questo processo. Sono inoltre coinvolti nella trained immunity alcuni enzimi della catena di trasporto elettronico mitocondriale, tra cui la succinato deidrogenasi sembrerebbe essere la più importante oltre che rappresentare uno dei più importanti target biologici dell’Itaconato. Il bilancio tra i due intermedi metabolici menzionati comporta la regolazione dell’attività di alcuni effettori della TI tra cui: jumonji domain-containing (JMJD) and ten eleven translocation (TET) che agirebbero principalmente attraverso la regolazione dell’acetilazione di alcuni istoni, di cui il più conosciuto sembrerebbe essere H3K4.
- I pathway di segnale attraverso i quali di estrinseca la TI non sono ancora del tutto stati identificati. Essa agirebbe, a seconda dello stimolo scatenante, attraverso MAPK pathway, NLRP3, NOD2, HIF1-alpha, NRF2.

Uno dei mediatori più studiati della TI è l’Itaconato. Esso deriva direttamente dalla conversione del cis-aconiato in itaconato ad opera dell’enzima immune responsive gene 1 (IRG1). Il cis aconiato deriva dalla trasformazione (ad opera dell’enzima Aconitase II) del citrato, per cui è

importante per la formazione dell'itaconate che la via glicolitica, ed in particolare piruvato deidrogenasi, funzioni per produrre acetil CoA che è il precursore del citrato.

L'espressione di IRG-1 è regolata sia dal punto di vista genetico che epigenetico:

- LPS incentiva la sua espressione attraverso una via che coinvolge l'attivazione di PKC;
- Una diminuzione della proteina deubiquitinase A20 determina l'aumento intracellulare dell'mRNA di IRG-1;
- miR93 diminuisce l'espressione di IRG-1 agendo sul fattore di trascrizione Interferon Regulatory Factor-9;
- diversamente Leukemia Inhibitory factor incentiva l'espressione di IRG-1 attraverso l'azione su JACK/STAT3.

L'itaconato agisce come antinfiammatorio, pronto a regolare l'attivazione ingiustificata ed eccessiva della cascata infiammatoria.

Esso agisce attraverso vari meccanismi:

- Blocca l'attività di succinato deidrogenasi. L'azione di questo enzima inserito nel complesso II della catena di trasporto elettronico mitocondriale è molto complessa. Esso, infatti, è in grado di catalizzare il trasporto reverse degli elettroni dal complesso II al complesso I attraverso l'ossidazione del succinato e la produzione del Coenzima Q ridotto. Questo processo porta alla produzione di anione superossido con successiva attivazione dell'inflammosoma;
- Blocca glucosio 6 fosfato chinasi: inibendo la glicolisi che è la via metabolica principale nei macrofagi M1 oltre ad essere la via principale per la sintesi di acetil Coa, precursore dell'itaconate (meccanismo a feedback negativo);
- Forma complessi con il glutatione con successiva riduzione delle difese cellulari antiossidanti. Questo meccanismo condurrebbe all'attivazione di potenti fattori di trascrizione antiossidanti come NRF2 attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione ATF3 (anche se non si esclude che l'itaconato possa avere un ruolo diretto in tale attivazione).

- Attivazione di NRF2: normalmente questo fattore di trascrizione antinfiammatorio ed antiossidante è confinato nel citoplasma bloccato dal legame con una proteina (KEAP1).

Itaconate induce l'alchilazione di KEAP1 con conseguente liberazione di NRF2.

All'interno della cellula esiste quindi una sorta di bilancia regolatoria della TI in cui l'itaconato svolge un ruolo di primaria importanza. In realtà studi in letteratura dimostrano come questa regolazione si basi essenzialmente sull'attività di due enzimi:

1. IRG-1: che indurrebbe la sintesi di itaconate inducendo immunotolleranza;
2. Succinate dehydrogenase (SDH): che invece induce immunoreattività.

L'utilizzo di LPS induce dall'prima un aumento delle citochine proinfiammatorie, seguito immediatamente dopo da un incentivo alla via dell'itaconato attraverso l'induzione di IRG-1. Diversamente la stimolazione cellulare con beta glucano induce esclusivamente immunoreattività, riducendo l'espressione di IRG-1 ed incentivando quella di SDH.

Esistono, inoltre, delle molecole in grado di emulare l'attività di itaconate in modelli sperimentali: Dimethyl Itaconate (DI) e 4-Octyl Itaconate (4-OI).

Il modello di danno epatico Ischemia/riperfusion (I/R) è un modello molto utilizzato dai ricercatori per l'induzione di un forte danno da stress ossidativo.

In letteratura scientifica sono presenti dati consistenti circa il ruolo fondamentale del pathway Itaconato/NRF2 nella protezione dal danno ossidoriduttivo indotto da I/R.

Topi IRG-1^{-/-} hanno mostrato un maggior danno epatico dopo I/R rispetto ai WT. Inoltre essi dimostravano un incremento dei livelli sistemici di IL-6 e tissutali di mRNA per IL-6 rispetto ai WT, dimostrando anche una maggiore predisposizione all'infiammazione sistemica.

Il trapianto di cellule macrofagiche midollari IRG-1^{-/-} in topi WT ha portato allo sviluppo di un danno maggiore da I/R. Anche cellule in coltura con mutazione IRG-1^{-/-} dopo I/R sono andate incontro maggiormente ad apoptosi e necrosi. La transfezione delle cellule e dei topi IRG-1^{-/-} con plasmidi in grado di indurre l'espressione di IRG-1 ha determinato la riduzione dei fenomeni appena descritti in seguito all'induzione del danno I/R. Oltretutto, la somministrazione di 4-OI ai topi IRG-1^{-/-} determina una netta riduzione del danno I/R indotto. Tali effetti sono dipendenti

dall'azione di NRF2 che si è dimostrato aumentato nelle cellule WT. Il suo silenziamento si associa ad un peggioramento del danno epatico.

Premesso ciò, è possibile ipotizzare un effetto sulla regolazione della TI esercitato da alcune alterazioni metaboliche che è possibile riscontrare in patologie come steatoepatite non-alcolica/sindrome metabolica, cirrosi e steatoepatite alcolica. In tali condizioni, infatti, si assiste ad una progressiva riduzione della capacità mitocondriale di ossidare i grassi con conseguente blocco della catena di trasporto elettronico mitocondriale per alterazione del bilancio intracellulare NAD⁺/NADH. Questo comporta la generazione di una alterazione del potenziale redox della cellula con conseguente danno da reactive oxygen species (ROS).

Ipotizzare un ruolo svolto da TI in tal senso risulta plausibile oltre che un affascinante topic di ricerca scientifica.

5.2 Scopo dello studio

Valutazione della disfunzione immunitaria con particolare riguardo a TI e pathway dell'itaconato nella cirrosi epatica.

5.3 Metodologia

- Arruolare pazienti affetti da epatite cronica, cirrosi epatica compensata e cirrosi scompensata, oltre che ovviamente controlli sani. Sottoporre i pazienti ad un prelievo di sangue venoso;
- Raccogliere tutte le informazioni cliniche desumibili dall'anamnesi e seguire prospetticamente l'insorgenza di eventi epato e non epatocorrelati così come gli accessi ospedalieri o necessità di intervento medico, il tasso di infezioni ecc.
- Dosare su sangue periferico marcatori di infiammazione (PCR, proteina sierica amiloide, IL-6, TNF-alpha, ed LPS)
- Isolare i monociti da sangue periferico ed applicare protocollo di stimolazione sequenziale Trained Immunity con dosaggio su supernatante di IL-6, TNF-alpha, IL-10, IL-1R

- Valutazione su supernatante del consumo di glucosio/produzione di lattato per analisi metabolismo cellulare
- Assessment of KEAP1/Nrf2 pathway

5.4 Risultati esperimenti pilota

Pazienti con cirrosi scompensata 46 vs 10 controlli

- L'attività TI è completamente abolita nei pazienti affetti da cirrosi epatica scompensata in relazione a controlli (figura 22)
- Correlazione inversa alla bivariata tra: livelli di LPS e produzione citochinica sistemica ($p: 0.0011$); risposta trained e tasso generale di infezioni ed ospedalizzazioni ($p: 0.002$ e 0.005 rispettivamente).
- Tra i pazienti cirrotici scompensati, coloro i quali conservano una buona reattività trained hanno il 42% di rischio di mortalità in meno (Kaplan-Meier estimates 79% vs 68%; $p=0.021$).

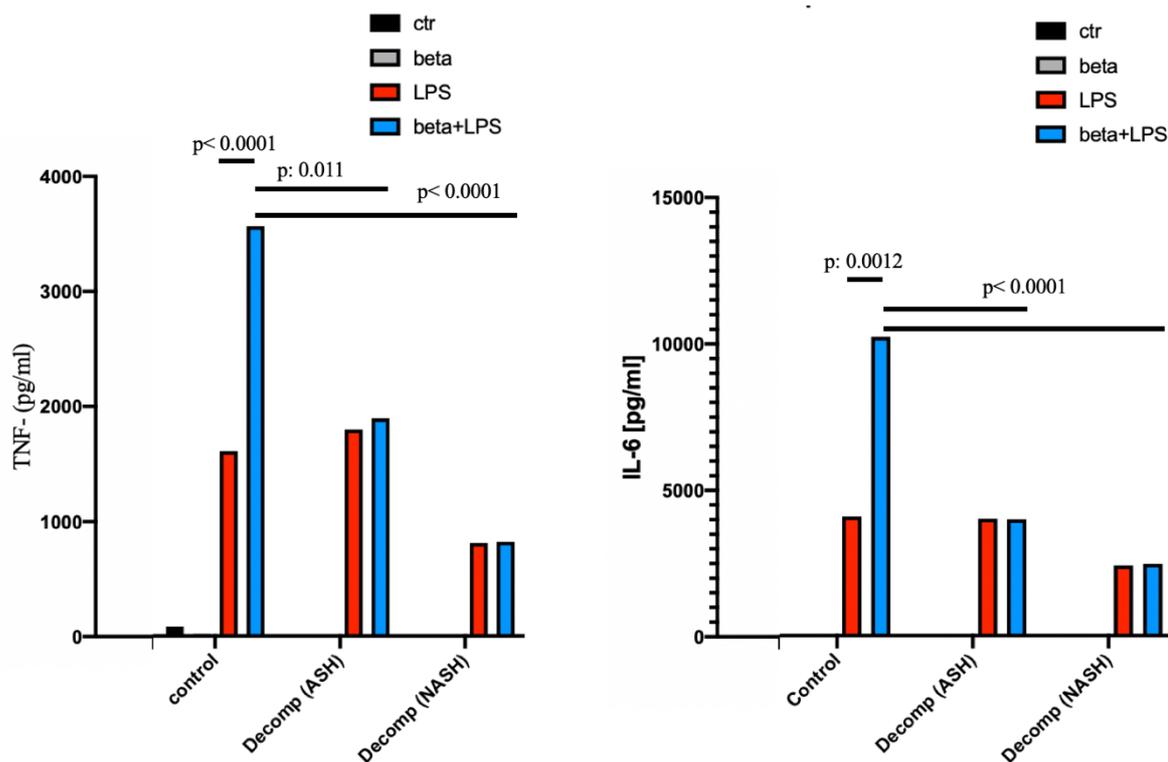


Figura 22: risultati reattività trained nella popolazione arruolata

5.5 Prospettive

E' stata stimata una numerosità campionaria competente al nostro scopo di 150 pazienti in totale. Ci aspettiamo di riscontrare un grado di disfunzione immunologica proporzionale all'avanzamento dello stadio patologico, mettendo in evidenza una disfunzione metabolica concomitante coltre che un'accentuazione ingiustificata della via dell'itaconato dei pazienti con scompenso per via del disordine metabolico insito in questo evento medico e della leaky gut associata.

Bibliografia

1. Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Annals of hepatology*. 2009;8 Suppl 1:S4-8.
2. Kleiner DE. Histopathology, grading and staging of nonalcoholic fatty liver disease. *Minerva gastroenterologica e dietologica*. 2018;64(1):28-38.
3. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine*. 2002;346(16):1221-31.
4. Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S, Bugianesi E, Grieco A, Fargion S, et al. 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. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2010;42(4):272-82.
5. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *Journal of hepatology*. 2010;53(2):372-84.
6. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of epidemiology*. 2007;17(11):863-9.
7. Shifflet A, Wu GY. Non-alcoholic steatohepatitis: an overview. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2009;108(1):4-12.
8. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet (London, England)*. 1999;353(9165):1634-6.
9. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2010;103(2):71-83.
10. Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *Journal of gastroenterology*. 2008;43(7):509-18.

11. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22(9):1129-33.
12. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*. 2005;16(4):421-7.
13. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in liver disease*. 2004;8(3):521-33.
14. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *The American journal of the medical sciences*. 2005;330(6):326-35.
15. Kim CH, Park JY, Lee KU, Kim JH, Kim HK. Fatty liver is an independent risk factor for the development of Type 2 diabetes in Korean adults. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2008;25(4):476-81.
16. Okamoto M, Takeda Y, Yoda Y, Kobayashi K, Fujino MA, Yamagata Z. The association of fatty liver and diabetes risk. *Journal of epidemiology*. 2003;13(1):15-21.
17. Shibata M, Kihara Y, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Nonalcoholic fatty liver disease is a risk factor for type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes care*. 2007;30(11):2940-4.
18. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, Day C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2008;51(3):444-50.
19. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017;37 Suppl 1:85-9.
20. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1343-51.

21. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology*. 2007;133(2):496-506.
22. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(2):72-81.
23. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1038-48.
24. Pfeiffer RM, Rotman Y, O'Brien TR. Genetic determinants of cirrhosis and hepatocellular carcinoma due to fatty liver disease: what's the score? *Hepatology*. (2020). 72:794–6.
25. Chalasani N, Guo X, Looma R, Goodarzi MO, Haritunians T, Kwon S, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterology*. (2010) 139:1567–76, 76.e1–6.
26. Taliento AE, Dallio M, Federico A, Prati D, Valenti L. Novel insights into the genetic landscape of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Environ Res Public Health*. (2019) 16:2755.
27. Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Ståhlman M, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M(rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol*.(2012) 57:1276–82.
28. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. (2014) 46:352–6.
29. Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, Mancina RM, Pipitone R, Karja V, et al. Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol*. (2015) 63:705–12.
30. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of European Descent. *Gastroenterology*. (2016) 150:1219–30.e6.

31. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD. 2005;15(4):316-28.
32. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. The New England journal of medicine. 2000;343(20):1467-76.
33. Knittel T, Janneck T, Muller L, Fellmer P, Ramadori G. Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. Hepatology (Baltimore, Md). 1996;24(2):352-60.
34. Scheen AJ, Luyckx FH. Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance: interface between gastroenterologists and endocrinologists. Acta clinica Belgica. 2003;58(2):81-91.
35. Friend A, Craig L, Turner S. The prevalence of metabolic syndrome in children: a systematic review of the literature. Metabolic syndrome and related disorders. 2013;11(2):71-80.
36. Parker VE, Savage DB, O'Rahilly S, Semple RK. Mechanistic insights into insulin resistance in the genetic era. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. 2011;28(12):1476-86.
37. Tolman KG, Dalpiaz AS. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. Therapeutics and clinical risk management. 2007;3(6):1153-63.
38. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes. 2001;50(8):1844-50.
39. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. Hepatology (Baltimore, Md). 2003;37(5):1202-19.
40. Yki-Jarvinen H. Fat in the liver and insulin resistance. Annals of medicine. 2005;37(5):347-56.
41. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. Science (New York, NY). 2005;307(5708):384-7.
42. McMillan KP, Kuk JL, Church TS, Blair SN, Ross R. Independent associations between liver fat, visceral adipose tissue, and metabolic risk factors in men. Applied physiology,

- nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 2007;32(2):265-72.
43. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science (New York, NY)*. 2003;300(5622):1140-2.
44. Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, Siqueira AC, Braga H, Freitas LA. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*. 2005;18(5):365-70.
45. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901-11.
46. Kolterman OG, Gray RS, Griffin J, Burstein P, Insel J, Scarlett JA, et al. Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*. 1981;68(4):957-69.
47. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2000;11(9):351-6.
48. Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(2):241-53.
49. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 2003;52(3):581-7.
50. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009;14(12):1484-95.
51. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;59(2):713-23.

52. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1999;30(6):1356-62.
53. Ali R, Cusi K. New diagnostic and treatment approaches in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Annals of medicine*. 2009;41(4):265-78.
54. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Jarvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2010;42(5):320-30.
55. Henley DV, Korach KS. Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling. *Hormones (Athens, Greece)*. 2010;9(3):191-205.
56. Yosefy C. Diabetic heart and the cardiovascular surgeon. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*. 2008;8(2):147-52.
57. Park MA, Hwang KA, Choi KC. Diverse animal models to examine potential role(s) and mechanism of endocrine disrupting chemicals on the tumor progression and prevention: Do they have tumorigenic or anti-tumorigenic property? *Laboratory animal research*. 2011;27(4):265-73.
58. Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *American journal of public health*. 2009;99 Suppl 3:S559-66.
59. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 1998;36(10):2149-73.
60. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*. 2010;126(4):760-8.
61. Tsai WT. Human health risk on environmental exposure to Bisphenol-A: a review. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 2006;24(2):225-55.

62. Vandenberg LN, Hunt PA, Myers JP, Vom Saal FS. Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Reviews on environmental health*. 2013;28(1):37-58.
63. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1526):2047-62.
64. Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Ntp cerhr mon*. 2008(22):v, vii-ix, 1-64 passim.
65. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology letters*. 2008;176(2):149-56.
66. Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Bernert JT, Ye X, Silva MJ, et al. Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environmental health perspectives*. 2011;119(1):131-7.
67. Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*. 2011;82(3):424-30.
68. Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, et al. An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2007;24(2):225-39.
69. Kang JH, Asai D, Katayama Y. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical reviews in toxicology*. 2007;37(7):607-25.
70. Murata M, Kang JH. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology advances*. 2018;36(1):311-27.
71. Braun JM. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nature reviews Endocrinology*. 2017;13(3):161-73.

72. Chevalier N, Fenichel P. Bisphenol A: Targeting metabolic tissues. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2015;16(4):299-309.
73. Dong S, Terasaka S, Kiyama R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2011;159(1):212-8.
74. Hwang KA, Park MA, Kang NH, Yi BR, Hyun SH, Jeung EB, et al. Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17 beta-estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor alpha and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;272(3):637-46.
75. Pupo M, Pisano A, Lappano R, Santolla MF, De Francesco EM, Abonante S, et al. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environmental health perspectives*. 2012;120(8):1177-82.
76. Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2002;1(7):515-24.
77. Lama S, Vanacore D, Diano N, Nicolucci C, Errico S, Dallio M, et al. Ameliorative effect of Silybin on bisphenol A induced oxidative stress, cell proliferation and steroid hormones oxidation in HepG2 cell cultures. *Scientific reports*. 2019;9(1):3228.
78. Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Novials A, Muhammed SJ, Salehi A, et al. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PloS one*. 2012;7(2):e31109.
79. Kang HS, Yang H, Ahn C, Kang HY, Hong EJ, Jaung EB. Effects of xenoestrogens on streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2014;65(2):273-82.

80. Gassman NR. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2017;58(2):60-71.
81. Piao X, Liu Z, Li Y, Yao D, Sun L, Wang B, et al. Investigation of the effect for bisphenol A on oxidative stress in human hepatocytes and its interaction with catalase. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2019;221:117149.
82. Vahdati Hassani F, Abnous K, Mehri S, Jafarian A, Birner-Gruenberger R, Yazdian Robati R, et al. Proteomics and phosphoproteomics analysis of liver in male rats exposed to bisphenol A: Mechanism of hepatotoxicity and biomarker discovery. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2018;112:26-38.
83. Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Gurler Z, Demirel HH, Kucukkurt I, et al. Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: protective role of boron. *Toxicology research*. 2019;8(2):262-9.
84. Malaise Y, Menard S, Cartier C, Gaultier E, Lasserre F, Lencina C, et al. Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development. *Scientific reports*. 2017;7(1):14472.
85. Thoene M, Rytel L, Dzika E, Wlodarczyk A, Kruminis-Kaszkiel E, Konrad P, et al. Bisphenol A Causes Liver Damage and Selectively Alters the Neurochemical Coding of Intrahepatic Parasympathetic Nerves in Juvenile Porcine Models under Physiological Conditions. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12).
86. Dekant W, Volkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008;228(1):114-34.
87. Kim YH, Kim CS, Park S, Han SY, Pyo MY, Yang M. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312(2):441-8.

88. Rainone F. Milk Thistle. *Am Fam Physician*, 2005;72(7):1285-8.
89. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules*. 2017;22(2):191.
90. Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, Pifferi G. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1993;18(3):289-97.
91. Wu, J.W.; Lin, L.C.; Hung, S.C.; Chi, C.W.; Tsai, T.H. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007;45, 635–641.
92. Voinovich, D.; Perissutti, B.; Grassi, M.; Passerini, N.; Bigotto, A. Solid state mechanochemical activation of *Silybum marianum* dry extract with betacyclodextrins: Characterization and bioavailability of the coground systems. *J. Pharm. Sci* 2009;98, 4119–4129.
93. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, Deng Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharmacol Sciences* 2015;10: 81-98.
94. Trappoliere M, Caligiuri A, Schmid M, Bertolani C, Failli P, Vizzutti F, Novo E, di Manzano C, Marra F, Loguercio C, Pinzani M. Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2009;50(6):1102-11.
95. Tsuruta S, Nakamuta M, Enjoji M, Kotoh K, Hiasa K, Egashira K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Int J Mol Med* 2004;14:837–842.
96. Haukeland JW, Dama's JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006;44:1167–1174.
97. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:397–416.

98. Carini R, Comoglio A, Albano E, Poli G. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. *Biochem. Pharmacol.* 1992;43(10):2111-5.
99. Salomone F, Galvano F, Marino Gammazza A, Paternostro C, Tibullo D, Bucchieri F, Mangiameli A, Parola M, Bugianesi E, Li Volti G. Silibinin improves hepatic and myocardial injury in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis* 2012;44(4):334-42.
100. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* 2001; 15(7):465-89.
101. Velussi M, Cernigoi AM, De Monte A, Dapas F, Caffau C, Zilli M. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol.* 1997; 26:871-9.
102. Loguercio C, Andreone P, Brisc C, Brisc MC, Bugianesi E, Chiamonte M, Cursaro C, Danila M, de Sio I, Floreani A, Freni MA, et al. Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:1658-65.
103. Stiuso P, Scognamiglio I, Murolo M, Ferranti P, De Simone C, et al. Serum oxidative stress markers and lipidomic profile to detect NASH patients responsive to an antioxidant treatment: a pilot study. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014:169216.
104. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry.* 1979;95(2):351-8.
105. Pastor R, Tur JA. Antioxidant Supplementation and Adaptive Response to Training: A Systematic Review. *Current pharmaceutical design.* 2019;25(16):1889-912.
106. Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addiction (Abingdon, England).* 1993;88(6):791-804.

107. Loguercio C, Di Pierro M, Di Marino MP, Federico A, Disalvo D, Crafa E, et al. Drinking habits of subjects with hepatitis C virus-related chronic liver disease: prevalence and effect on clinical, virological and pathological aspects. *Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire). 2000;35(3):296-301.
108. Nicolucci C, Errico S, Federico A, Dallio M, Loguercio C, Diano N. Human exposure to Bisphenol A and liver health status: Quantification of urinary and circulating levels by LC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017;140:105-12.
109. Nicolucci C, Rossi S, Menale C, del Giudice EM, Perrone L, Gallo P, et al. A high selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantization of BPA urinary levels in children. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013;405(28):9139-48.
110. Mersch-Sundermann V, Knasmuller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. 2004;198(1-3):329-40.
111. Iori E, Vinci B, Murphy E, Marescotti MC, Avogaro A, Ahluwalia A. Glucose and fatty acid metabolism in a 3 tissue in-vitro model challenged with normo- and hyperglycaemia. *PloS one*. 2012;7(4):e34704.
112. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N et al., "Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection," *Hepatology* 2006;43,6,:1317–1325.
113. "Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network," *Hepatology* 2003; 37,2:244
114. Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, and Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American Journal of Gastroenterology* 1999;94, 9:2467–2474.

115. Cao ZJ, Li J, Wang Y et al. Serum hepatocyte apoptosis biomarker predicts the presence of significant histological lesion in chronic hepatitis B virus infection. *Digestive and Liver Disease* 2016;48,12:1463–1470.
116. Boursier J, Zarski JP, de Ledinghen V, et al. Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology* 2013;57,3:1182–1191.
117. Sasso M, Miette V, Sandrin L, and Beaugrand M. The controlled attenuation parameter (CAP): a novel tool for the noninvasive evaluation of steatosis using Fibroscan. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2012;36,1:13–20.
118. (SINU) SIdNU, “Tabelle LARN 2014,” 2014, http://www.sinu.it/html/pag/tabelle_larn_2014_rev.asp.
119. Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, De La Fuente JR, and Grant M. Development of the alcohol use disorders identification test (AUDIT): WHO collaborative project on early detection of persons with harmful alcohol consumption–II. *Addiction* 1993, vol. 88, no. 6, pp. 791–804.
120. Wang Y, Fan Q, Wang T, Wen J, Wang H, and Zhang T. Controlled attenuation parameter for assessment of hepatic steatosis grades: a diagnostic meta-analysis,” *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8,10:17654–17663.
121. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental health perspectives*. 2006;114(1):106-12.
122. Chavez-Tapia NC, Mendez-Sanchez N, Uribe M. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of internal medicine*. 2006;144(5):379; author reply 80.
123. Fan JG, Zhu J, Li XJ, Chen L, Lu YS, Li L, et al. Fatty liver and the metabolic syndrome among Shanghai adults. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2005;20(12):1825-32.

124. Shankar A, Teppala S. Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults. *Journal of environmental and public health*. 2012;2012:481641.
125. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental health perspectives*. 2005;113(8):926-33.
126. Huc L, Lemarie A, Gueraud F, Helies-Toussaint C. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2012;26(5):709-17.
127. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews*. 2009;30(1):75-95.
128. Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environmental health perspectives*. 2009;117(5):784-9.
129. Inoue H, Yokota H, Makino T, Yuasa A, Kato S. Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2001;29(8):1084-7.
130. Koch HM, Kolossa-Gehring M, Schroter-Kermani C, Angerer J, Bruning T. Bisphenol A in 24 h urine and plasma samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2009: a retrospective exposure evaluation. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2012;22(6):610-6.
131. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical research in toxicology*. 2002;15(10):1281-7.

132. Cifarelli V, Hursting SD. Obesity, Diabetes and Cancer: A Mechanistic Perspective. *International journal of diabetology & vascular disease research*. 2015;2015(Suppl 4)
133. Sookoian S and Pirola CJ. Repurposing drugs to target nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology* 2019;25,15:1783–1796.
134. Singh S, Osna NA, and Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: a review. *World Journal of Gastroenterology* 2017;23,36:6549–6570.
135. Bhushan B, Banerjee S, Paranjpe S et al., “Pharmacologic Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Suppresses Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Fast-Food Diet Model,” *Hepatology*, 2019;70(5):1546-1563.
136. Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C et al. A new silybinvitamin E-phospholipid complex improves insulin resistance and liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: preliminary observations. *Gut* 2006;55,6:901-902.
137. Motamed N, Rabiee B, Poustchi H et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10-year risk of cardiovascular diseases. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2017;41,1:31–38.
138. Taliento AE, Dallio M, Federico A, Prati D, Valenti L. Novel insights into the genetic landscape of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16:2755.
139. Shen J, Wong GL, Chan HL, Chan RS, Chan HY, Chu WC, et al. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:139–46.
140. Scorletti E, Bhatia L, McCormick KG, Clough GF, Nash K, Calder PC, et al. Design and rationale of the WELCOME trial: a randomised, placebo controlled study to test the efficacy of purified long chainomega-3 fatty acid treatment in non-alcoholic fatty liver disease. *Contemp Clin Trials* 2014;37:301–11.

141. Mulder WJM, Ochando J, Joosten LAB, Fayad ZA and Netea MG. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 Jul;18(7):553-566.
142. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016;352(6284):aaf1098.
143. Bekkering S, Blok BA, Joosten LA, Riksen NP, van Crevel R, Netea MG. In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes. *Clin Vaccine Immunol* 2016;23(12):926-933.