
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Profilul genetic și variațiile clinico-biologice ale Paraoxonazei 1 la pacienții cu steatohepatită non-alcoolică

Doctorand **Milaciu Vasile Mircea**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Monica Acalovschi**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Steatohepatita non-alcoolică	19
1.1. Contextul epidemiologic al bolii ficatului gras non-alcoolic și al steatohepatitei non-alcoolice	19
1.2. Istoria naturală a steatohepatitei non-alcoolice în cadrul bolii ficatului gras non-alcoolic	20
1.3. Factori de risc/etiologici pentru FGNA și SHNA	21
1.4. Patogeneza SHNA	23
1.5. Comorbidități	27
1.6. Diagnostic și evoluție spre hepatocarcinom	28
1.7. Noi perspective terapeutice	29
2. Paraoxonaza 1 – roluri și modularea lor	31
2.1. Structura Paraoxonazei 1 (PON1) și legarea de HDL	31
2.2. Concentrație enzimatică, activități și efecte antioxidante	31
2.3. Genetica PON1	33
2.4. Factori non-genetici care influențează fenotipul PON1	34
2.5. Relevanța clinică a PON1	37
3. Stres-ul oxidativ, inflamația și Paraoxonaza 1 la pacienții cu FGNA/SHNA	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	45
2. Metodologie generală	47
2.1. Material și metodă	47
2.2. Determinări biochimice	49
2.3. Determinarea polimorfismelor genetice ale <i>PON1</i>	50
2.4. Analiza statistică	52
3. Studiul 1. Factori de risc pentru SHNA	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	55
3.3. Material și metodă	56
3.3.1. Criterii de includere	56
3.3.2. Criterii de excludere	56
3.3.3. Variabile măsurate	57
3.3.4. Analiza statistică	57
3.4. Rezultate	57
3.5. Discuții	63
3.6. Concluzii	66
4. Studiul 2. Concentrația serică a PON1 și polimorfismele <i>PON1</i> în SHNA – variabile asociate	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru	67
4.3. Material și metodă	68
4.4. Rezultate	69
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	78
5. Studiul 3. Biomarkeri asociați scorurilor non-invazive de fibroză și steatoză la pacienții cu SHNA	79
5.1. Introducere	79

5.2. Ipoteza de lucru	80
5.3. Material și metodă	80
5.4. Rezultate	82
5.5. Discuții	92
5.6. Concluzii	95
6. Concluzii generale	97
7. Originalitatea tezei	99
REFERINȚE (278 de cote bibliografice)	101

Cuvinte-cheie: boala ficatului gras non-alcoolică, steatohepatita non-alcoolică, steatoză hepatică, Paraoxonaza-1, polimorfisme genetice, polimorfismele *PON1*, stres oxidativ, inflamație, fibroză hepatică, scoruri non-invazive de fibroză hepatică, scoruri non-invazive de steatoză hepatică, citokine, Periostina

Introducere

Boala ficatului gras non-alcoolică sau ficatul gras non-alcoolic (BFGNA) cuprinde un spectru de entități clinice distincte, care pornesc de la simpla încărcare cu grăsimi a ficatului (steatoza hepatică simplă/ficat gras non-alcoolic – FGNA) și merg până la steatohepatită non-alcoolică (SHNA) și ciroză hepatică. Fiind bine dovedit faptul că este asociată cu sindromul metabolic, a devenit în ultimii ani o adevărată „epidemie”, incidența bolii crescând odată cu creșterea prevalenței obezității, a insulinorezistenței și a diabetului zaharat. Steatohepatita non-alcoolică este practic varianta agresivă a spectrului BFGNA, a cărei fiziopatologie încă nu este pe deplin elucidată, fiind avansate mai multe teorii, care nu pot explica pe deplin apariția și progresia bolii.

Paraoxonaza 1 (PON1) este o enzimă secretată la nivel hepatic, cu proprietăți antioxidante. Există numeroase studii care au evaluat activitățile PON1 la pacienți cu afecțiuni hepatice, dar puține dintre acestea au fost conduse pe loturi de pacienți cu FGNA, și mai puține pe loturi de pacienți cu SHNA. Rezultatele acestor studii au arătat că activitățile PON1 au fost mai scăzute la pacienții cu SHNA comparativ cu loturile de control, dar au existat și rezultate neconcludente. Acestea pot fi parțial explicate prin faptul că enzima este influențată atât de factori externi, cât și de polimorfisme ale genei *PON1*.

Pornind de la aceste premise, prezenta lucrare și-a propus să evalueze atât statusul biochimic al PON1, cât și polimorfismele genei *PON1*, la pacienți cu steatohepatită non-alcoolică.

Stadiul actual al cunoașterii

Boala ficatului gras non-alcoolic (BFGNA) este în prezent recunoscută ca fiind cea mai comună cauză de afectare hepatică la nivel mondial, având o incidență în continuă creștere. Steatohepatita non-alcoolică reprezintă una dintre bolile spectrului BFGNA, cu evoluție mai precoce spre fibroză avansată și ciroză hepatică.

În primul capitol al primei părți a tezei, am descris steatohepatita non-alcoolică pornind de la contextul epidemiologic și istoria naturală, discutând ulterior factorii de risc pentru apariție și progresie, patogeniza bolii, comorbiditățile asociate, diagnosticul și evoluția spre hepatocarcinom și, nu în ultimul rând, noile perspective terapeutice.

În capitolul 2, am descris rolurile PON1 (în principal exercitate prin legarea de particulele de HDL-colesterol), structura acestei enzime, aspecte legate de utilitatea măsurării concentrației serice și a activităților enzimei, cât și efectele antioxidante și antiinflamatorii ale acesteia. În continuare, am descris elementele relevante referitoare la genetica PON1, încheind capitolul cu relevanța clinică a acestei enzime.

În ultimul capitol am tratat aspectele actuale legate de interrelația stres oxidativ-PON1 la pacienți cu hepatopatii cronice, și în special la cei cu boli din spectrul BFGNA. În final, am subliniat potențialele direcții de cercetare în acest domeniu.

Contribuția personală

Cele trei studii care fac obiectul prezentei cercetări au fost efectuate pe diferite cohorte de pacienți cu SHNA. Scopul acestora a fost de a evalua concentrația serică a PON1 și profilul genetic (polimorfismele *PON1*), pentru a stabili dacă acestea sunt modificate la pacienții cu SHNA comparativ cu subiecți sănătoși. Totodată, am căutat posibile asocieri între concentrația serică a PON1 și scoruri non-invasive de fibroză și steatoză hepatică. În ultimul studiu am evaluat și posibila asociere între un marker de fibroză hepatică (periostina) și aceste scoruri.

Studiile care fac parte din acest capitol au avut un design de tip analitic, observațional, prospectiv, transversal, de tip caz-control sau de cohortă, s-au derulat în cadrul Spitalului Clinic Căi Ferate Cluj-Napoca, și au fost inițiate cu aprobarea Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Nr. 404/02.07.2015. Acestea au fost finanțate parțial cu ajutorul fondurilor proiectului de cercetare numărul 7690/72/15.04.2016 și 5200/62/01.03.2017 („Profilul genetic și variațiile clinico-biologice ale Paraoxonazei 1 la pacienții cu steatohepatită non-alcoolică”), acordat prin concurs autorului de către Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

Studiul 1. Factori de risc pentru SHNA

Ipoteza de lucru

Scopul acestui studiu a fost de a identifica factorii de risc asociați steatohepatitei non-alcoolice, într-o populație de pacienți din România.

Material și metodă

Studiul a fost de tip analitic, observațional, prospectiv, transversal și de tip caz-control. A avut loc în perioada iulie 2015 - iulie 2019 în Spitalul Clinic CF din Cluj-Napoca, România. Am studiat un grup de 81 de pacienți adulți (18-70 de ani, dintre care 43 de bărbați) diagnosticați cu SHNA ecografic, prin excluderea consumului semnificativ de alcool, excluderea cirozei hepatice și a hepatocarcinomului, și prin persistența unui sindrom de hepatocitoliză, pentru care s-au exclus alte etiologii. Totodată, am inclus în studiu și un grup de control compus din 81 de subiecți la care a fost exclusă orice formă de boală din spectrul BFGNA. Criteriile de excludere au fost stricte, neincluzând în studiu subiecți cu alte afecțiuni care ar putea influența nivelul seric al PON1. Toți pacienții au fost monitorizați cel puțin 6 luni înainte de includerea în studiu. Pentru fiecare subiect, s-au notat elementele anamnestice și indicele de masă corporală (IMC), circumferința taliei. S-au determinat din ser: glicemia, colesterolul total, HDL-colesterolul, bilirubina totală, albumina serică, trombocitele, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), fosfataza alcalină (FA) și gamma-glutamil transpeptidaza (GGT).

Rezultate

Mediana vârstei subiecților în cele două loturi a fost 51 de ani. Am observat diferențe semnificative statistic între cele două loturi în ceea ce privește circumferința taliei și valoarea IMC. Nu au existat diferențe semnificative între loturi în ceea ce privește fumatul. Comorbiditățile cardiovasculare (hipertensiunea arterială - HTA, cardiopatie ischemică cronică, angină pectorală de efort stabilă) au fost semnificativ statistic mai frecvente în lotul SHNA comparativ cu lotul martor, la fel ca și diabetul zaharat de tip 2 (DZT2), prediabetul, sindromul metabolic (SM) și litiaza biliară veziculară. Atât valorile medii ale enzimelor de hepatocitoliză și colestază, cât și trigliceridele au fost semnificativ mai mari în lotul SHNA. HDL-colesterolul a fost semnificativ mai scăzut în lotul SHNA comparativ cu lotul martor. Bilirubina totală și colesterolul total nu au prezentat diferențe semnificative între grupuri. În regresia logistică binară multivariată, variabilele care au fost asociate în mod independent cu riscul de prezență a SHNA au fost IMC-ul, antecedentele familiale de boli cardiovasculare și prezența hipertensiunii arteriale.

Concluzii

1. Pacienții din lotul cu SHNA au avut un IMC și o circumferință a taliei semnificativ mai mari decât subiecții din lotul martor, având totodată mai frecvent antecedente heredocolaterale de boli cardiovasculare.
2. În lotul cu SHNA am observat o frecvență semnificativ mai mare a următoarelor comorbidități: HTA, prediabet și DZT2, SM, cardiopatia ischemică cu angină pectorală de efort stabilă și litiază biliară veziculară.
3. Am observat diferențe semnificative între loturi în cazul valorilor glicemiei, ale AST, ALT, FA, GGT, HDL-colesterolului, trigliceridelor, albuminei serice și a trombocitelor.
4. Valorile serice ale colesterolului total și ale bilirubinei totale nu au prezentat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri.
5. În analiza multivariată, singurele variabile asociate independent semnificativ statistic cu prezența SHNA au fost IMC-ul, prezența antecedentelor heredocolaterale de boli cardiovasculare și a HTA.

Studiul 2. Concentrația serică a PON1 și polimorfismele *PON1* în SHNA – variabile asociate

Ipoteză de lucru

Scopul principal al acestui studiu a fost examinarea potențialului rol al polimorfismelor genetice ale *PON1* ca factor de risc pentru SHNA. Un alt obiectiv a fost evaluarea concentrațiilor serice ale *PON1* la pacienții cu SHNA. Ultimul obiectiv a fost identificarea factorilor care influențează nivelul concentrației serice a *PON1* la acești pacienți.

Material și metodă

Studiul a fost de tip analitic, observațional, prospectiv, transversal și de tip caz-control. Loturile de studiu au fost aceleași ca și în studiul 1, doar că, pe lângă elementele discutate deja în studiul 1, pentru fiecare subiect a fost determinată concentrația serică *PON1* (folosind kituri ELISA pentru *PON1* umană). Totodată, pentru fiecare subiect s-a realizat genotiparea polimorfismelor *PON1* L55M, Q192R și C-108T (folosind metoda PCR-RFLP).

Rezultate

Concentrația *PON1* a fost semnificativ statistic mai redusă în grupul cu SHNA, comparativ cu grupul martor ($p < 0,001$). Nu am observat o diferență semnificativă statistic între distribuția în cele două grupuri ale polimorfismelor Q192R și C-108T. Polimorfismul L55M a avut cea mai mare variabilitate între grupuri, varianta heterozigotă LM fiind prezentă la 58% dintre pacienții din grupul SHNA și doar la 33,3% dintre pacienții din grupul de control. Genotipul sălbatic LL a fost prezent la 27,2% dintre pacienții din grupul SHNA și la 54,3% dintre subiecții lotului de control. Am găsit astfel o diferență semnificativă statistic între cele două grupuri ($p = 0,002$). Procentul de subiecți care au avut fie genotip LM, fie MM a fost de 72,8% în grupul SHNA și doar 45,7% în grupul martor ($p < 0,001$). În regresia logistică binară multivariată s-au identificat variabilele asociate în mod independent cu riscul de prezență a SHNA: IMC (OR=2.11; $p < 0,001$), antecedentele heredocolaterale de boli cardiovasculare (OR=4,53; $p = 0,02$) și prezența genotipurilor care conțin alelele recesive (LM+MM) ale polimorfismului L55M (OR=3.43; $p = 0,04$). O asociere semnificativă statistic cu concentrația *PON1* a fost observată pentru istoricul familial

al bolilor cardiovasculare, SM, HTA, prediabet și polimorfismul L55M ($p=0,015$), în special variantele LM+MM ($p=0,004$). Am corelat concentrația PON1 cu celelalte variabile, observând o corelație semnificativă statistic între concentrația PON1 și IMC, circumferința taliei, albumina serică, HDL-colesterol, trigliceride, AST, ALT, FA și GGT. Într-un model de regresie liniară multivariată, prezența SHNA a fost singura variabilă asociată semnificativ statistic cu concentrația PON1.

Concluzii

1. Pacienții din lotul SHNA au avut o concentrație serică a PON1 diminuată semnificativ statistic în comparație cu subiecții din grupul de control.
2. O asociere semnificativă statistic a fost observată între concentrația serică scăzută a PON1 și prezența istoricului familial de boli cardiovasculare, a sindromului metabolic, hipertensiunii arteriale și a prediabetului.
3. O asociere semnificativă statistic a fost observată între concentrația serică a PON1 și polimorfismul L55M al genei *PON1*. Genotipurile L55M ale *PON1* care conțineau alela mutantă (LM+MM) au fost un predictor independent pentru prezența SHNA.
4. Într-un model de regresie liniară multivariată, prezența SHNA a fost singura variabilă legată independent de concentrația serică PON1.

Studiul 3. Biomarkeri asociați scorurilor non-invazive de fibroză și steatoză la pacienții cu SHNA

Ipoteză de lucru

Scopul acestui studiu a fost evaluarea concomitentă a concentrației serice a PON1 și a periostinei (POSTN), a statusului citokinelor pro-inflamatorii (TNF- α , IL-6) și anti-inflamatorii (IL-10), într-o cohortă de pacienți cu SHNA, corelând totodată rezultatele obținute cu valorile celor mai validate scoruri non-invazive pentru steatoza hepatică și fibroza hepatică.

Material și metodă

Studiul a fost de tip observațional, analitic, prospectiv, transversal, de tip cohortă, realizat în perioada ianuarie 2016-iulie 2019. Au fost incluși 52 de pacienți diagnosticați cu SHNA, toți pacienții fiind înrolați consecutiv (număr egal de bărbați și femei). Criteriul de înrolare în studiu a fost diagnosticul stabilit de SHNA, conform cu criteriile de includere și excludere descrise în studiile anterioare. Pentru fiecare pacient, s-au notat elemente clinice și antropometrice și s-au determinat parametri uzuali de laborator și valorile serice ale IL-6, IL-10, TNF- α , Hs-CRP, concentrația PON1 și nivelurile serice ale POSTN. Ecografic, s-a apreciat severitatea steatozei pacienților în 3 grade. Pentru fiecare pacient, am calculat scorurile non-invazive de fibroză: NFS, FIB-4, indicele APRI și scorul BARD, folosind calculatoarele disponibile online gratuit online.

Rezultate

Prezența SM a fost asociată cu scoruri semnificative statistic mai mari pentru scorul NFS, scorul FIB-4 și scorul BARD. Scorurile NFS și FIB-4 au fost puternic corelate cu vârsta pacienților și moderat corelate cu valorile serice ale IL-6. Scorul NFS a prezentat o corelație moderată cu IMC-ul pacienților și o corelație slabă cu nivelul seric al TNF- α . Scorul BARD a fost puternic corelat cu IMC-ul pacienților și slab corelat cu nivelurile serice ale IL-6. Pentru a evalua asocierea independentă a variabilelor clinice și de laborator cu scorurile de fibroză, am folosit regresii

liniare, care au arătat că vârsta, sindromul metabolic și valorile serice ale TNF- α au fost asociate semnificativ statistic cu NFS. Sindromul metabolic a fost singura variabilă independentă asociată semnificativ statistic cu scorul BARD. TNF- α a fost asociat cu scorul BARD, dar sub pragul semnificației statistice. În analiza univariată, severitatea steatozei apreciată ecografic a fost asociată semnificativ statistic cu IMC-ul, prezența DZT2, a SM, cu valorile serice ale IL-6, și cu scorurile de fibroză NFS și BARD. Dintre citokinele evaluate, IL-6 a fost cel mai strâns corelată cu gradul de severitate a steatozei. Dintre scorurile non-invazive de fibroză, cel mai bine s-au corelat cu gradul de severitate a steatozei scorul BARD și scorul NFS. Steatoza ușoară a fost comparată cu steatoza moderată/severă folosind regresia logistică multivariată. Prezența steatozei moderată/severă a fost mai probabilă la pacienții cu SM (OR-6.27) sau IL-6 >4 ng/ml (OR-6.31).

Concluzii

1. Nu am observat o diferență semnificativă statistic între sexe, în ceea ce privește scorurile non-invazive de fibroză sau gradele de severitate a steatozei.
2. Nivelul seric al TNF- α și vârsta pacienților au fost asociate semnificativ statistic cu scorurile non-invazive de fibroză hepatică.
3. Scorurile NFS și FIB-4 au fost puternic corelate cu vârsta pacienților și moderat corelate cu valorile serice ale IL-6.
4. Prezența SM a fost asociată semnificativ statistic cu scorurile non-invazive de fibroză hepatică.
5. Gradul ecografic moderat/sever al steatozei a fost mai frecvent asociat cu prezența SM sau nivelurile serice crescute ale IL-6.
6. Nivelul seric ale POSTN și concentrația serică a PON-1 nu s-au corelat cu scorurile non-invazive ale fibrozei hepatice, și nici cu gradele de severitate ale steatozei, însă această observație necesită verificare pe un număr mai mare de pacienți cu SHNA.

Concluzii generale

1. Pacienții din lotul cu SHNA au avut un IMC și o circumferință a taliei semnificativ mai mari decât subiecții din lotul martor, prezentând mai frecvent antecedente heredocolaterale de boli cardiovasculare.
2. În lotul cu SHNA am observat o frecvență semnificativ mai mare a următoarelor comorbidități, comparativ cu lotul martor: HTA, prediabet și DZT2, SM, cardiopatie ischemică cu angină pectorală de efort stabilă și litiază biliară veziculară.
3. Am observat diferențe semnificative între loturi în cazul valorilor glicemiei, ale AST, ALT, FA, GGT, HDL-colesterolului, trigliceridelor, albuminei serice și a trombocitelor, în timp ce valorile serice ale colesterolului total și ale bilirubinei totale nu au prezentat diferențe semnificative statistic între grupuri.
4. În analiza multivariată, singurele variabile asociate independent semnificativ statistic cu prezența SHNA au fost IMC-ul mai mare, prezența antecedentelor familiale de boli cardiovasculare și a HTA.
5. Pacienții din lotul SHNA au avut o concentrație serică a PON1 semnificativ statistic mai diminuată în comparație cu subiecții din grupul de control.
6. O asociere semnificativă statistic a fost observată între concentrația serică scăzută a PON1 și prezența istoricului familial de boli cardiovasculare, a prediabetului, a SM și HTA.
7. O asociere semnificativă statistic a fost observată între concentrația serică a PON1 și polimorfismul L55M al genei *PON1*.

8. Genotipurile L55M ale *PON1* care conțineau alela mutantă (LM+MM) au fost un predictor independent pentru prezența SHNA.
9. Într-un model de regresie liniară multivariată, prezența SHNA a fost singura variabilă legată independent de concentrația serică PON1.
10. Nu am observat o diferență semnificativă statistic între sexe, în ceea ce privește scorurile non-invazive de fibroză sau gradele de severitate a steatozei la pacienți cu SHNA.
11. Scorurile NFS și FIB-4 au fost puternic corelate cu vârsta pacienților cu SHNA și moderat corelate cu valorile serice ale IL-6.
12. Nivelul seric al TNF- α și vârsta pacienților cu SHNA au fost asociate semnificativ statistic cu scorurile non-invazive de fibroză hepatică.
13. Prezența SM la pacienți cu SHNA a fost asociată semnificativ statistic cu scorurile non-invazive de fibroză hepatică.
14. Gradul moderat/sever al steatozei hepatice a fost mai frecvent observat la pacienții cu SM sau cu nivel seric crescut al IL-6.
15. Concentrațiile serice ale PON-1 și nivelurile serice ale POSTN nu s-au corelat cu scorurile non-invazive de fibroză hepatică, și nici cu gradele de severitate ale steatozei, cu mențiunea că această observație necesită verificare pe un număr mai mare de pacienți cu SHNA.

Originalitatea tezei

Originalitatea prezentei teze este susținută prin următoarele:

1. Conform evaluării în principalele baze de date, acesta este primul studiu din literatură în care a fost realizată genotiparea PON1 la pacienții cu SHNA.
2. Este primul studiu din literatură care a evaluat atât concentrația PON1, cât și distribuția principalelor polimorfisme ale genei PON1 la pacienții cu SHNA.
3. Este primul studiu din literatură care a determinat, concomitent, la un lot de pacienți cu SHNA, atât concentrația serică a PON1, cât și nivelurile serice ale POSTN și ale principalelor citokine pro- sau anti-inflamatorii.
4. A fost realizată în premieră, pe un lot de pacienți cu SHNA, cuantificarea scorurilor non-invazive de fibroză hepatică și a scorului ecografic de severitate a steatozei hepatice și corelarea acestora cu valorile serice ale TNF- α , IL-6, IL-10, POSTN și PON1.
5. Rezultatele sugerează posibilitatea încorporării expresiei clinice/genetice a PON1 în scorurile neinvazive. Pentru a obține un plus de acuratețe în stabilirea diagnosticului SHNA în absența

ABSTRACT OF THE PHD THESIS

Genetic profile and clinical-biological variations of Paraoxonase 1 in patients with non-alcoholic steatohepatitis

PhD student **Milaciu Vasile Mircea**

Doctoral supervisor **Prof. Dr. Monica Acalovschi**

SUMMARY

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
4. Non-alcoholic steatohepatitis	19
1.1. Epidemiological context of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis	19
1.2. The natural history of non-alcoholic steatohepatitis in the non-alcoholic fatty liver disease spectrum	20
1.3. Risk/etiological factors for NAFL and NASH	21
1.4. NASH pathogenesis	23
1.5. Comorbidities	27
1.6. Diagnosis and evolution towards hepatocellular carcinoma	28
1.7. New therapeutic perspectives	29
5. Paraoxonase 1 – roles and their modulation	31
2.1. Paraoxonase 1 (PON1) structure and HDL binding	31
2.2. Enzymatic concentration, activities and antioxidant properties	31
2.3. PON1 genetics	33
2.4. Non-genetic factors that influence the PON1 phenotype	34
2.5. Clinical relevance of PON1	37
6. Oxidative stress, inflammation and Paraoxonase 1 in patients with NAFL/NASH	39
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Study hypothesis	45
2. General methodology	47
2.1. Material and method	47
2.2. Biochemical determinations	49
2.3. Determination of genetic polymorphisms of <i>PON1</i>	50
2.4. Statistical analysis	52
3. Study 1. Risk factors for NASH	55
3.1. Introduction	55
3.2. Study hypothesis	55
3.3. Material and method	56
3.3.1. Inclusion criteria	56
3.3.2. Exclusion criteria	56
3.3.3. Measured variables	57
3.3.4. Statistical analysis	57
3.4. Results	57
3.5. Discussions	63
3.6. Conclusions	66
4. Study 2. Serum PON1 concentration and PON1 polymorphisms in NASH - associated variables	67
4.1. Introduction	67
4.2. Study hypothesis	67
4.3. Material and method	68
4.4. Results	69
4.5. Discussions	76
4.6. Conclusions	78
5. Study 3. Biomarkers associated with non-invasive fibrosis and steatosis scores in patients with NASH	79
5.1. Introduction	79

5.2. Study hypothesis	80
5.3. Material and method	80
5.4. Results	82
5.5. Discussions	92
5.6. Conclusions	95
6. General conclusions	97
7. The originality of the thesis	99
REFERENCES (278 references)	101

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis, hepatic steatosis, Paraoxonase-1, genetic polymorphisms, PON1 polymorphisms, oxidative stress, inflammation, liver fibrosis, non-invasive hepatic fibrosis scores, non-invasive steatosis scores , Periostin

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) comprises a spectrum of distinct clinical entities, ranging from simple fatty liver loading (simple hepatic steatosis/non-alcoholic fatty liver - NAFL) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and liver cirrhosis. Being well proven to be associated with the metabolic syndrome, it has become a real "epidemic" in recent years, the incidence of the disease increasing due to a high prevalence of obesity, insulin resistance and diabetes. Non-alcoholic steatohepatitis is basically the aggressive variant of the NAFLD spectrum, whose pathophysiology is not yet fully elucidated, several theories being proposed, which cannot fully explain the inception and progression of the disease.

Paraoxonase 1 (PON1) is an enzyme excreted by the liver, which exerts antioxidant properties. There are numerous studies that have evaluated the activities of PON1 in patients with liver disease, but few have been conducted in groups of patients with NAFLD, and fewer in groups of patients with NASH. The results of these studies showed that PON1 activities were lower in patients with NASH compared to control groups, but there were also inconclusive results. These can be partly explained by the fact that the enzyme is influenced by both external factors and polymorphisms of the *PON1* gene.

Based on these premises, the present work aimed to evaluate both the biochemical status of PON1 and the polymorphisms of the *PON1* gene in patients with NASH.

Current state of knowledge

Non-alcoholic fatty liver disease is currently recognized as the most common cause of liver impairment worldwide, with a growing incidence. Non-alcoholic steatohepatitis is one of the diseases of the NAFLD spectrum, with an earlier evolution towards advanced fibrosis and liver cirrhosis.

In the first chapter of the first part of the thesis, we described NASH starting from the epidemiological context and natural history, then discussing risk factors for onset and progression, disease pathogenesis, associated comorbidities, diagnosis and progression to hepatocellular carcinoma and the new therapeutic perspectives.

In Chapter 2, we described the roles of PON1 (mainly exerted by binding to HDL-cholesterol particles), the structure of this enzyme, issues related to the usefulness of measuring serum concentration and enzyme activities, and its antioxidant and anti-inflammatory effects. Next, we described the relevant elements related to the genetics of PON1, concluding the chapter with the clinical relevance of this enzyme.

In the last chapter we treated the current aspects related to the oxidative stress-PON1 interrelation in patients with chronic liver diseases, and especially in those with diseases from the NAFLD spectrum. Finally, we highlighted the potential directions of research in this field.

Personal contribution

The three studies that are the subject of the present research were performed on different cohorts of patients with NASH. Their aim was to evaluate the serum concentration of PON1 and the genetic profile (*PON1* polymorphisms), to establish whether they are altered in patients with NASH compared to healthy subjects. We also searched for possible associations between serum PON1 concentration and non-invasive scores of liver fibrosis and steatosis. In the last study we

also evaluated the possible association between a marker of liver fibrosis (periostin) and these scores.

The studies that are part of this chapter had an analytical, observational, prospective, transversal, case-control or cohort type design, were carried out within the CF Clinical Hospital Cluj-Napoca, and were initiated with the approval Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, Nr. 404/07.02.2015. These were partially funded by research project funds 7690/72/15.04.2016 and 5200/62/01.03.2017 ("Genetic profile and clinical-biological variations of Paraoxonase 1 in patients with non-alcoholic steatohepatitis"), granted to the author after competition by the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca.

Study 1. Risk factors for NASH

Study hypothesis

The aim of this study was to identify the risk factors associated with non-alcoholic steatohepatitis in a population of patients from Romania.

Material and method

The study was analytical, observational, prospective, cross-sectional and case-control. It was conducted between July 2015 and July 2019 in the CF Clinical Hospital in Cluj-Napoca, Romania. We studied a group of 81 adult patients (18-70 years, of whom 43 men) diagnosed with NASH by ultrasound, by excluding significant alcohol consumption, excluding liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, and by the persistence of a hepatocytolysis syndrome, for which we excluded other etiologies. At the same time, we included in the study a control group composed of 81 subjects in which any disease from the NAFLD spectrum was excluded. The exclusion criteria were strict, not including in the study subjects with other conditions that could influence the serum level of PON1. All patients were monitored for at least 6 months prior to inclusion in the study. For each subject, we recorded the anamnesis elements, body mass index (BMI) and the waist circumference. Also, we determined from serum: glycemia, total cholesterol, HDL-cholesterol, total bilirubin, serum albumin, platelets, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT).

Results

The median age of the subjects in the two groups was 51 years. We observed statistically significant differences between the two groups for waist circumference and BMI. There were no statistically significant differences between the groups regarding smoking habits. Cardiovascular comorbidities (hypertension – HTA, chronic ischemic heart disease, stable angina pectoris) were statistically significantly more common in the NASH group compared to the control group, as well as type 2 diabetes mellitus (T2DM), pre-diabetes, metabolic syndrome (MS) and gallbladder lithiasis. Both the mean values of hepatocytolysis and cholestasis enzymes, and the serum triglycerides levels were significantly higher in the NASH group. HDL-cholesterol was significantly lower in the NASH group compared to the control group. Total bilirubin and total cholesterol did not show significant differences between groups. In the multivariate binary logistic regression, the variables that were independently associated with the risk of NASH were the BMI, family history of cardiovascular disease, and the presence of hypertension.

Conclusions

6. Patients in the NASH group had a BMI and a waist circumference significantly larger than the subjects in the control group, while also having a more frequent family history of cardiovascular disease.
7. In the NASH group we observed a significantly higher frequency of the following comorbidities: hypertension, pre-diabetes and T2DM, MS, ischemic heart disease with stable angina pectoris and gallbladder lithiasis.
8. We observed significant differences between groups in the serum values of glycemia, AST, ALT, ALP, GGT, HDL-cholesterol, triglycerides, serum albumin and platelets count.
9. Serum values of total cholesterol and total bilirubin did not show statistically significant differences between the two groups.
10. In the multivariate analysis, the only variables independently statistically significantly associated with the presence of NASH were the BMI, the presence of family history of cardiovascular disease, and hypertension.

Study 2. Serum PON1 concentration and *PON1* polymorphisms in NASH - associated variables

Study hypothesis

The main aim of this study was to examine the potential role of *PON1* genetic polymorphisms as a risk factor for NASH. Another objective was to evaluate serum PON1 concentrations in patients with NASH. The last objective was to identify the factors that influence the level of serum PON1 concentration in these patients.

Material and method

The study was analytical, observational, prospective, cross-sectional and case-control. The study groups were the same as in study 1, except that, in addition to the elements already discussed in study 1, the serum PON1 concentration was determined for each subject (using human ELISA kits for PON1). At the same time, for each subject, the genotyping of *PON1* L55M, Q192R and C-108T polymorphisms was performed (using the PCR-RFLP method).

Results

PON1 concentration was statistically significantly lower in the NASH group compared to the control group ($p < 0.001$). We did not observe a statistically significant difference between the distribution in the two groups of the Q192R and the C-108T polymorphisms. The L55M polymorphism had the highest variability between groups, the heterozygous variant LM being present in 58% of patients in the NASH group and only in 33.3% of patients in the control group. Wild LL genotype was present in 27.2% of patients in the NASH group and in 54.3% of subjects from the control group. Thus, we found a statistically significant difference between the two groups ($p = 0.002$). The percentage of subjects who had either LM or MM genotype was 72.8% in the NASH group and only 45.7% in the control group ($p < 0.001$). In the multivariate binary logistic regression, the variables independently associated with the risk of NASH were identified: BMI (OR=2.11; $p < 0.001$), family history of cardiovascular disease (OR=4.53; $p = 0.02$) and the presence of genotypes containing the recessive alleles (LM+MM) of the L55M polymorphism (OR=3.43; $p = 0.04$). A statistically significant association with PON1 concentration was observed

for the family history of cardiovascular disease, MS, hypertension, pre-diabetes and the L55M polymorphism ($p=0.015$), especially for the LM+MM variants ($p=0.004$). We correlated the PON1 concentration with the other variables, recording a statistically significant correlation between the PON1 concentration and BMI, waist circumference, serum albumin, HDL-cholesterol, triglycerides, AST, ALT, ALP and GGT. In a multivariate linear regression model, the presence of NASH was the only variable statistically significantly associated with the PON1 concentration.

Conclusions

5. Patients in the NASH group had a statistically significantly decreased serum PON1 concentration compared to subjects in the control group.
6. A statistically significant association was observed between low serum PON1 concentration and the presence of a family history of cardiovascular disease, metabolic syndrome, hypertension and pre-diabetes.
7. A statistically significant association was observed between serum PON1 concentration and the L55M polymorphism of the *PON1* gene. The L55M genotypes of *PON1* containing the mutant allele (LM+MM) were an independent predictor for the presence of NASH.
8. In a multivariate linear regression model, the presence of NASH was the only variable related independently to serum PON1 concentration.

Study 3. Biomarkers associated with non-invasive fibrosis and steatosis scores in patients with NASH

Study hypothesis

The aim of this study was the concomitant assessment of serum PON1 and periostin (POSTN), pro-inflammatory (TNF- α , IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine status in a cohort of patients with NASH, while correlating the obtained results with the values of the most validated non-invasive scores for liver steatosis and fibrosis.

Material and method

The study was observational, analytical, prospective, cross-sectional, cohort type, conducted between January 2016 and July 2019. We included 52 patients diagnosed with NASH, all of them being enrolled consecutively (equal number of men and women). The enrollment criterion in the study was the established diagnosis of NASH, according to the inclusion and exclusion criteria described in previous studies. For each patient, clinical and anthropometric elements were recorded and we determined usual laboratory parameters and serum values of IL-6, IL-10, TNF- α , Hs-CRP, PON1 concentration and serum POSTN levels. Ultrasound severity of patients' steatosis was assessed in 3 degrees. For each patient, we calculated the following non-invasive fibrosis scores: NFS, FIB-4, APRI index and BARD score, using calculator tools available online for free.

Results

The presence of MS was associated with statistically significantly higher values for the NFS score, the FIB-4 score and the BARD score. NFS and FIB-4 scores were strongly correlated with patient age and moderately correlated with serum IL-6 levels. The NFS score showed a moderate correlation with patients' BMI and a poor correlation with serum TNF- α levels. BARD score was strongly correlated with patients' BMI and poorly correlated with serum IL-6 levels. To evaluate

the independent association of clinical and laboratory variables with the fibrosis scores, we used linear regressions, which showed that age, MS, and serum TNF- α values were statistically significantly associated with the NFS. Metabolic syndrome was the only independent variable statistically significantly associated with the BARD score. TNF- α was associated with the BARD score, but below the statistical significance threshold. In the univariate analysis, the severity of ultrasound-assessed steatosis was statistically significantly associated with BMI, the presence of T2DM, MS, serum IL-6 levels, NFS and BARD fibrosis scores. From the evaluated cytokines, IL-6 was most closely correlated with the severity of steatosis. From the non-invasive fibrosis scores, BARD score and NFS were best correlated with the severity of steatosis. Mild steatosis was compared with moderate/severe steatosis using multivariate logistic regression. The presence of moderate/severe steatosis was more likely in patients with MS (OR-6.27) or IL-6 >4 ng/ml (OR-6.31).

Conclusions

7. We did not observe a statistically significant difference between the genders regarding the non-invasive fibrosis scores or degrees of steatosis severity.
8. Serum TNF- α levels and the age of the patients were statistically significantly associated with the non-invasive liver fibrosis scores.
9. NFS and FIB-4 scores were strongly correlated with the age of the patients and moderately correlated with serum IL-6 levels.
10. The presence of MS was statistically significantly associated with non-invasive liver fibrosis scores.
11. Moderate/severe ultrasound degree of steatosis was more frequently associated with the presence of MS or elevated serum IL-6 levels.
12. Serum POSTN levels and serum PON1 concentrations were not correlated with non-invasive liver fibrosis scores or steatosis severity, but this observation requires verification in a larger number of patients with NASH.

General conclusions

16. Patients in the NASH group had a BMI and a waist circumference significantly larger than the subjects in the control group, with a significantly higher frequency of family history of cardiovascular disease.
17. In the group with NASH we observed a significantly higher frequency of the following comorbidities, compared to the control group: hypertension, pre-diabetes and T2DM, MS, ischemic heart disease with stable angina pectoris and gallbladder lithiasis.
18. We observed statistically significant differences between groups regarding the values of glycemia, AST, ALT, ALP, GGT, HDL-cholesterol, triglycerides, serum albumin and platelets, while the serum values of total cholesterol and total bilirubin did not present a statistically significant difference between groups.
19. In the multivariate analysis, the only variables independently associated with the presence of NASH were higher BMI, family history of cardiovascular disease and hypertension.
20. Patients in the NASH group had a statistically significantly lower serum PON1 concentration compared to subjects in the control group.

21. A statistically significant association was observed between the low serum concentration of PON1 and the presence of a family history of cardiovascular disease, pre-diabetes, MS and hypertension.
22. A statistically significant association was observed between serum PON1 concentration and the L55M polymorphism of the *PON1* gene.
23. L55M genotypes of *PON1* containing the mutant allele (LM+MM) were an independent predictor for the presence of NASH.
24. In a multivariate linear regression model, the presence of NASH was the only variable related independently to the serum PON1 concentration.
25. We did not observe a statistically significant difference between the genders in terms of non-invasive fibrosis scores or degrees of steatosis severity in patients with NASH.
26. The NFS and the FIB-4 score were strongly correlated with the age of NASH patients and moderately correlated with serum IL-6 levels.
27. Serum TNF- α levels and the age of NASH patients were statistically significantly associated with the non-invasive liver fibrosis scores.
28. The presence of MS in patients with NASH has been statistically significantly associated with the non-invasive liver fibrosis scores.
29. Moderate/severe liver steatosis was more commonly seen in patients with MS or elevated serum IL-6 levels.
30. Serum PON-1 concentration and serum POSTN levels were not correlated with non-invasive liver fibrosis scores, nor with the severity of steatosis, noting that this observation requires verification in a larger number of patients with NASH.

The originality of the thesis

The originality of the thesis is supported by the following:

6. According to the major databases' evaluation, this is the first study in the literature in which *PON1* genotyping was performed in patients with NASH.
7. It is the first study in the literature that evaluated both the concentration of PON1 and the distribution of the main polymorphisms of the *PON1* gene in patients with NASH.
8. It is the first study in the literature that determined, simultaneously, in a group of patients with NASH, both the serum concentration of PON1 and the serum levels of POSTN and the main pro- or anti-inflammatory cytokines.
9. The quantification of non-invasive liver fibrosis scores and the ultrasound score of hepatic steatosis severity and their correlation with serum values of TNF- α , IL-6, IL-10, POSTN and PON1 were performed for the first time in a group of patients with NASH.
10. The results suggest the possibility of incorporating the clinical/genetic expression of PON1 in non-invasive scores, in order to obtain an additional accuracy in establishing the diagnosis of NASH without liver biopsy.