

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

## EXTENDED ABSTRACT

**Background:** La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è una delle epatopatie attualmente predominanti nei paesi con stile di vita occidentale, destinata rapidamente a diventare la causa più comune di danno epatico cronico, fibrosi, cirrosi e carcinoma epatocellulare (HCC), così come la prima indicazione per trapianto al mondo (1). La sua prevalenza globale è attualmente di circa il 25% della popolazione generale, con una diffusione a macchia d'olio interessante sempre più aree geografiche.

La NAFLD colpisce 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) (2,3) con notevole diffusione anche tra la popolazione giovanile: risulta, infatti, la più comune patologia epatica tra gli adolescenti del Nord-America (4).

Ancora oggi non esiste una terapia curativa per questa patologia; pertanto, l'analisi e la comprensione dei meccanismi alla base dello sviluppo e della sua progressione appare l'unica strada percorribile volta all'ideazione di un trattamento efficace.

Gli interferenti endocrini sono sostanze chimiche in grado di influenzare la biologia del sistema endocrino (5), principalmente concentrati negli imballaggi alimentari o nei residui di insetticidi per colture alimentari.

In particolare, il bisfenolo A (BPA) è una sostanza chimica il cui iperaccumulo è stato messo in correlazione con lo sviluppo di diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e malattie cardiovascolari (6, 7).

Come tutti gli interferenti endocrini è particolarmente concentrato nelle plastiche in policarbonato spesso utilizzate nella fabbricazione di contenitori per alimenti e bevande, oltre ad essere un componente essenziale delle resine epossidiche. Usi aggiuntivi del BPA includono oggetti di uso quotidiano, come il rivestimento di compact disc, apparecchiature elettroniche, automobili, carta riciclata (6, 7).

Il lavoro di tesi di Dottorato si è quindi articolato durante i diversi anni dall'esplorazione di una nuova teoria patogenetica alla ricerca di una possibile strategia terapeutica, arricchendosi, inoltre, dell'analisi nuovi polimorfismi genetici relati alla malattia ad elevato impatto predittivo sull'outcome terapeutico.

### Obiettivi:

Coorte I: osservazionale

- *Studio clinico:* Valutare i livelli plasmatici ed urinari del bisfenolo A nei pazienti affetti da NAFLD rispetto ai soggetti sani e correlarlo all'entità della necroinfiammazione e fibrosi epatica documentata istologicamente.
- *Studio in vitro:* in cellule umane HepG2 valutazione degli effetti derivanti dell'esposizione a diverse concentrazioni di bisfenolo A sia sull'induzione dello stress ossidativo che sulla proliferazione cellulare.

Coorte II: trial clinico

- 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 esposti al BPA.
- Valutare l'effetto della genetica (con particolare riferimento ai seguenti single nucleotide Polimorfisms: PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926 ed MBOAT7

rs641738) sulla risposta terapeutica alla somministrazione di silibina complessata con vitamina D e vitamina E (RealSIL 100D®).

**Metodi:** La coorte I, si è composta di 60 pazienti con diagnosi istologica di NAFLD con o senza T2DM e 60 soggetti sani. L'esposizione dei pazienti NAFLD al BPA è stata valutata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e spettrometria di massa sia su campioni plasmatici che urinari. Il potenziale perossidativo posseduto dall'interferente endocrino è stato valutato mediante quantificazione di thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) con apposito kit. Sul modello cellulare HepG2 esposte a dosi crescenti di BPA è stata inoltre effettuata un'analisi di proliferazione cellulare mediante saggio MTT.

La coorte II si è composta di 60 pazienti NAFLD sottoposti all'assunzione di 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 del braccio placebo. Tutti i pazienti della II coorte sono stati seguiti per ulteriori 6 mesi dopo il termine del trattamento al fine di valutare l'eventuale perpetuazione dell'effetto benefico eventualmente derivante dall'assunzione del farmaco anche dopo la sua interruzione.

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 di follow-up (T12) una valutazione nutrizionale (WinFood, Medimatica s.r.l., Martinsicuro, Italia), di parametri clinici, test ematochimici di routine, la valutazione del modello omeostatico di insulino-resistenza, NAFLD fibrosis score (NFS), FIB-4, TBARS, oltre che la determinazione di tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , interleuchina (IL)-18 e IL-22, metalloproteinasi 2, epidermal growth factor receptor (EGFR), insulin growth factor (IGF)-II, cluster di differenziazione (CD)-44, high mobility group box-1, Endocan, fibroscan e controlled attenuation parameter (CAP).

È stata quindi eseguita una subanalisi sui pazienti risultanti non-responder al trattamento. Dopo adeguato screening genetico, 32 pazienti hanno mostrato almeno una mutazione tra PNPLA3 I148I/M, I148M/M, TM6SF2 167E/K, 167K/K e MBOAT7 TMC4C/T o TMC4T/T e sono stati paragonati, in termini di outcome terapeutico, a 60 pazienti wild type (30 sottoposti al trattamento descritto in precedenza e 30 non trattati di controllo).

Per tale subanalisi, 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. L'intero protocollo di studio è disponibile su <https://www.Clinicaltrials.gov> (NCT04640324).

### **Risultati:**

I pazienti NAFLD ed in particolare quelli affetti da steatoepatite (p: 0,04), hanno mostrato livelli significativamente maggiori di BPA nel plasma e nelle urine rispetto ai pazienti di controllo (p <0,0001), confermandosi, inoltre, una diretta associazione tra esposizione al BPA, danno perossidativo e stadio istologico di malattia (p: 0.03). Dopo una dieta priva di BPA per 1 mese, i pazienti con NAFLD hanno mostrato una significativa riduzione dei suoi livelli circolanti (p<0,02), senza significativa riduzione dei livelli urinari.

Il modello cellulare appositamente costruito ha invece evidenziato il potenziale proliferativo (p<0,0001) ed ossidativo (p<0,0001) posseduto da BPA per concentrazioni di 0,05  $\mu$ M mantenuto in coltura per 48 ore.

Per quanto concerne la coorte II, sei mesi dopo il baseline, la percentuale di pazienti con NAFLD trattati che hanno manifestato un miglioramento statisticamente significativo di alanina aminotransferasi (ALT) e gamma glutamiltranspeptidasi ( $\gamma$ GT) è stata maggiore rispetto ai pazienti 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) ed al termine del periodo di osservazione (T12). Alla fine del periodo di osservazione (T12), la proporzione di pazienti NAFLD trattati che hanno mantenuto il miglioramento ALT e  $\gamma$ GT ha mostrato una significativa riduzione, diventando simile a quella dei non trattati ( $p= 0:143$ ;  $p= 0:091$ ). 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). Questa differenza è rimasta statisticamente significativa al T12 ( $p= 0:04$ ,  $p= 0:04$ ,  $p= 0:03$  e  $p= 0:04$ , rispettivamente).

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- $\alpha$  ( $p= 0.03$  e  $p= 0.037$ , rispettivamente). Questi parametri nel gruppo trattato sono diventati simili a quelli dei pazienti non trattati a T12 ( $p= 0.112$  e  $p= 0.657$ , rispettivamente). Non ci sono stati cambiamenti significativi della ferritina ai tre tempi di osservazione per entrambi i gruppi di studio.

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- $\beta$  e MMP-2 è stata maggiore nei pazienti trattati rispetto a quelli non trattati ( $p= 0.04$ ,  $p= 0.04$ ,  $p= 0.03$ ,  $p= 0.03$ , e  $p= 0.02$ , rispettivamente). Al T12, il miglioramento si è mantenuto ( $p= 0.04$ ,  $p= 0.04$ ,  $p= 0.04$  e  $p= 0.03$ , rispettivamente). 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, in merito alla subanalisi per la genetica, nel nostro contesto clinico, solo il gruppo wild type trattato ha mostrato un miglioramento statisticamente significativo di glicemia, insulinemia, HOMA-IR, ALT, CRP, e TBARS dopo sei mesi di trattamento. L'analisi di regressione logistica ha confermato che, per tutti i parametri migliorati, il genotipo ha svolto un ruolo cruciale nell'ottenimento di un effetto terapeutico utile, indipendentemente da altre variabili confondenti: età, sesso, comorbidità, farmaci, stiffness 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.

### **Conclusioni:**

I risultati del nostro studio evidenziano il ruolo del BPA come fattore ambientale coinvolto nella progressione di NAFLD.

Abbiamo dimostrato la maggiore esposizione al BPA dei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli. In particolare, i pazienti con attiva necroinfiammazione tissutale, ed in maniera direttamente proporzionale ad essa, presentavano livelli più alti di BPA plasmatico rispetto a quelli con steatosi semplice. Per quanto potenzialmente eliminabile dall'organismo grazie al mantenimento di un efficiente emuntorio renale, il BPA richiede diverso tempo prima di poter essere completamente rimosso, soprattutto a causa della sua elevata lipoaffinità che ne determina accumulo tissutale.

È proprio su tale motivazione che ricade la scelta della strategia terapeutica utilizzata in tale contesto clinico vista, inoltre, la dimostrazione dell'effetto pro-ossidante e proliferativo svolto da tale contaminante ambientale sulle Hep-G2. L'attività fortemente antiossidante del complesso farmacologico utilizzato nel trial clinico per taluni parametri si è dimostrata dipendente dalla sua assunzione. Quanto e come tale strategia terapeutica possa impattare sulla prognosi dei pazienti non è ancora noto ma l'identificazione dei fattori predittivi di risposta al trattamento nell'epoca della medicina personalizzata di Precisione certamente rappresenta la pietra miliare per l'evoluzione di questo interessante ambito di ricerca.

## **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. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of epidemiology*. 2007;17(11):863-9.
3. Shifflet A, Wu GY. Non-alcoholic steatohepatitis: an overview. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2009;108(1):4-12.
4. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet (London, England)*. 1999;353(9165):1634-6.
5. 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.
6. 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.
7. Murata M, Kang JH. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology advances*. 2018;36(1):311-27.
8. 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.