



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie Mediche Sperimentali e applicate

Indirizzo Pneumologia sperimentale e clinica” - XXV Ciclo

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S)

SSD MED/10

RUOLO DELL'OSAS E DELL'OBESITA' NELLA PATOGENESI DELLE ALTERAZIONI INFIAMMATORIE, FUNZIONALI, METABOLICHE E CARDIOVASCOLARI IN PAZIENTI OSAS E VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DELLA TERAPIA A LUNGO TERMINE CON CPAP

IL DOTTORE
DR.SSA MARIA BUTTACAVOLI

IL TUTOR
PROF.SSA MARIA R. BONSIGNORE

IL COORDINATORE
PROF. CARLA GIORDANO

IL REFERENTE DI INDIRIZZO
PROF.SSA MARIA R. BONSIGNORE

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

Indice

1. RIASSUNTO	pag. 4
2. OSAS (Obstructive sleep apnea syndrome)	
2.1 Definizione, Epidemiologia e fattori di rischio	pag. 6
2.2 Clinica, Diagnosi e Terapia	pag. 10
2.3 OSAS e Rischio cardiovascolare:	pag. 16
- <i>IH, stress ossidativo e infiammazione</i>	pag. 17
- <i>Disfunzione endoteliale e alterazioni cardiovascolari</i>	pag. 22
2.4 OSAS, obesità e sindrome metabolica:	pag. 24
- <i>IH e insulino-resistenza</i>	pag. 27
- <i>Effetti di IH e obesità</i>	pag. 30
3. OSAS ed alterazioni epatiche (NAFLD)	pag. 35
3.1 Definizione	pag. 35
3.2 Epidemiologia	pag. 37
3.3 Fisiopatologia: - <i>Ruolo insulino-resistenza</i>	pag. 39
- <i>Ruolo stress ossidativo</i>	pag. 42
- <i>Ruolo adipochine e citochine</i>	pag. 43
3.4 Clinica	pag. 47
3.5 Diagnosi: - <i>Parametri bioumorali</i>	pag. 48
- <i>Diagnostica per immagini</i>	pag. 48
3.6 Terapia e storia naturale	pag. 51

4. OSAS e NAFLD: associazione o nesso causale?	pag. 53
5. CONTRIBUTO SPERIMENTALE:	pag. 62
5.1 Scopo della Tesi	pag. 62
5.2 Materiali e Metodi	pag. 63
5.3 Risultati	pag. 68
5.4 Discussione e Conclusioni	pag. 91
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 97

1. RIASSUNTO

Le attività di ricerca svolte nei tre anni di Dottorato e riassunte nella tesi hanno riguardato diversi aspetti della problematica clinica delle alterazioni di funzionalità epatica nei pazienti OSAS. La tesi si articola in differenti protocolli di ricerca tra loro complementari. In particolare, è stata analizzata la prevalenza dell'aumento degli enzimi epatici in una serie di 102 pazienti consecutivi studiati nel Laboratorio per i Disturbi Respiratori nel Sonno di Palermo, e in una serie di pazienti studiati a Palma di Maiorca, Ospedale di Son Dureta, con cui il nostro gruppo collabora da diversi anni. Tale studio ha consentito di identificare i fattori di rischio per aumento delle transaminasi sieriche nei pazienti OSAS utilizzando due diverse popolazioni, rivelando un effetto minimo o assente dei disturbi respiratori nel sonno a paragone dell'effetto rilevante dell'obesità associata all'OSAS. Un dato meritevole di attenzione nei due campioni è la correlazione inversa tra transaminasi sieriche ed età, indicativo di più severe alterazioni metaboliche nei pazienti relativamente giovani rispetto a quelli di mezz'età o anziani.

Un altro protocollo, assai impegnativo anche se eseguito su 15 pazienti, ha riguardato gli effetti della terapia dell'OSAS con CPAP sulla steatosi e la fibrosi epatica valutate mediante metodiche non invasive durante un follow-up di 1 anno. Questo studio suggerisce che l'OSAS favorisce l'accumulo di grassi a livello epatico (steatosi), mentre non sono state osservate significative variazioni elastografiche dopo correzione dell'OSAS. In particolare, il grado di steatosi epatica valutato ecograficamente diminuiva dopo terapia con CPAP,

e correlava con il grado di obesità soltanto durante il follow-up, in assenza di significative variazioni del range di indice di massa corporea del campione.

Infine, uno studio effettuato in collaborazione con la Sezione di Gastroenterologia del DiBiMIS in pazienti con epatopatia steatosica non alcolica (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) documentata mediante biopsia epatica, del quale sono disponibili i dati preliminari, suggerisce che l'OSAS ed in particolare l'ipossiemia notturna si associa a più alta prevalenza di fibrosi epatica e aumento delle lesioni a carico dei vasi arteriosi sistemici.

2. OSAS (Obstructive sleep apnea syndrome)

2.1 Definizione, Epidemiologia e fattori di rischio

La Sindrome dell'Apnea Ostruttiva nel Sonno (Obstructive Sleep Apnea Syndrome, OSAS) è una patologia cronica caratterizzata da ricorrenti episodi di ostruzione parziale o completa delle vie aeree superiori durante il sonno. La conseguente riduzione del flusso d'aria porta spesso a gravi alterazioni degli scambi gassosi con desaturazioni ossiemoglobiniche e ricorrenti risvegli dal sonno. Il sonno poco riposante contribuisce alla patogenesi della sonnolenza diurna, mentre le ripetute desaturazioni possono contribuire al deterioramento cognitivo che spesso si osserva in questi pazienti(1). Se non trattata, l'OSAS causa eccessiva sonnolenza diurna, riduzione della prestazione lavorativa, e scadimento della qualità di vita (2).

Anche se tale patologia è stata identificata soltanto 30 anni fa, la conoscenza sull'OSAS si è rapidamente diffusa in ambito medico, a causa della sua alta prevalenza e dei suoi effetti debilitanti. Gli studi sulla popolazione generale hanno evidenziato che apnee ostruttive in assenza di sintomi sono rilevabili in un'alta percentuale di soggetti (24% degli uomini e 9% delle donne), e circa il 50% dei pazienti afferenti ad un Laboratorio del Sonno non presentano il sintomo della sonnolenza. Nonostante l'alta prevalenza delle apnee ostruttive nel sonno nella popolazione generale (3), la diagnosi avviene solo in una parte di casi a causa dell'ancora insufficiente consapevolezza della patologia e della variabilità dei sintomi.

La severità della malattia è generalmente espressa come indice di apnea-ipopnea (“apnea-hypopnea index”, AHI), cioè come numero di apnee e ipopnee medio per ora di sonno. L’AHI >5 è il criterio più usato negli studi epidemiologici sulla prevalenza dell’OSA, che è stata analizzata nella popolazione generale in vari studi, effettuati negli impiegati statali del Wisconsin (Wisconsin Sleep Cohort)(3), nella città di Busselton in Australia (4), nelle contee di Dauphin e Lebanon in Pennsylvania(5,6), in Spagna (7) Cina (8,9),Korea (10) ed India (11). I risultati concordano sull’alta frequenza di eventi ostruttivi nella popolazione generale (AHI>5 nel 24% degli uomini e nel 9% delle donne), mentre la prevalenza dell’OSAS considerata sulla base dell’associazione eventi respiratori ostruttivi-sonnolenza diurna è approssimativamente del 4% negli uomini e del 2% nelle donne. (6) (Tabella 1).

Tabella 1. *Prevalenza dell’OSAS nella popolazione generale (Punjabi et al, 2008)²*

Country	First Author (Reference)	N	Ethnicity	Diagnostic Method	Prevalence	
					Men	Women
United States	Young (7)	602	White	Polysomnography	4.0%	2.0%
	Bixler (9)	1,741	White	Polysomnography	3.9%	1.2%
Australia	Bearpark (10)	485	White	MESAM IV*	3.1%	–
India	Udwadia (15)	250	Indian	Polysomnography	7.5%	4.5%
China	Ip (12)	258	Chinese	Polysomnography	4.1%	–
	Ip (13)		Chinese	Polysomnography	–	2.1%
Korea	Kim (14)	457	Korean	Polysomnography	4.5%	2.3%

Secondo i criteri diagnostici attualmente in uso, il riscontro di >15 apnee ostruttive/ora alla polisomnografia (PSG) o di 5 apnee/ora associate alla presenza di sintomi, configura la diagnosi di OSAS.

I pazienti sono spesso ignari dei loro sintomi durante il sonno, che vengono spesso identificati dal partner. Inoltre, gli operatori sanitari di diverse specialità mediche non hanno ricevuto la formazione necessaria per contribuire ad identificare la patologia ed intervenire precocemente sulla sua storia clinica. Pertanto è essenziale la conoscenza dei fattori di rischio per l'apnea ostruttiva del sonno per indirizzare l'attenzione diagnostica ai soggetti ad alto rischio.

Il principale fattore di rischio per l'OSAS è l'eccessivo peso corporeo, essendo il 70% dei pazienti con OSAS in sovrappeso o obesi (12,13). L'aumento di peso è associato a peggioramento dell'OSAS, mentre la perdita di peso, sia come risultato di una dieta ristretta o di chirurgia bariatrica, riduce la gravità della malattia (14-16). Peppard et al. (17) hanno valutato per due volte, a intervalli di 4 anni, un campione di soggetti della popolazione generale (n=690) per variabili antropometriche e apnea del sonno. Rispetto ai soggetti che avevano mantenuto un peso stabile nel tempo, i soggetti che erano aumentati di peso del 10% mostravano un incremento approssimativo del 32% dell'AHI, e un rischio circa sei volte maggiore di diagnosi di OSAS ($AHI \geq 15$ eventi/h). Al contrario, in coloro che avevano perso peso, un calo ponderale del 10% si associava a una riduzione dell'AHI del 26%.

L'obesità peggiora la meccanica delle vie aeree superiori durante il sonno attraverso l'aumento del grasso di deposito parafaringeo con conseguente riduzione di volume delle vie aeree superiori. Dal punto di vista clinico, alcune misure antropometriche, come la circonferenza del collo e la circonferenza della vita, riflettono il grado di obesità viscerale e appaiono associate ad un

maggiore rischio di OSAS a prescindere dal valore convenzionale dell'indice di massa corporea (body mass index o BMI) (18).

La prevalenza delle apnee ostruttive varia con il sex, essendo più alta negli uomini che nelle donne, con rapporto 2:1 (3,6,7). La predisposizione maschile per la malattia è in parte spiegata dalla distribuzione centrale, o androide, del tessuto adiposo. L'obesità periferica tipica del sesso femminile spiega in parte la minore gravità dell'OSAS nelle donne rispetto agli uomini con simile peso corporeo. Influenze ormonali possono concorrere a determinare le differenze di genere. Per esempio, Bixler e coll. in uno studio sulla popolazione femminile nella contea di Lebanon in Pennsylvania, USA, riportava una bassa prevalenza della malattia (0.6%) nelle donne in premenopausa rispetto al valore osservato nelle donne in post-menopausa (5.5%); le donne in post-menopausa che facevano terapia ormonale sostitutiva presentavano una prevalenza dell'OSAS bassa (1.1%) (6). In un campione di popolazione di donne suddivise in gruppi in base all'indice di massa corporea (BMI), l'aumento della circonferenza del collo era un fattore di rischio molto più importante di russamento rispetto all'aumento del solo BMI (19), riflettendo probabilmente la maggiore tendenza alla deposizione di grasso "periferico" nel sesso femminile.

2.2 Clinica, diagnosi e terapia

Il paziente con la Sindrome dell'Apnea Ostruttiva è solitamente un soggetto di media età, sovrappeso o francamente obeso, iperteso, con una storia di russamento, senso di soffocamento durante la notte, nicturia, eccessiva sonnolenza diurna. All'esame clinico, può essere evidente un lieve deterioramento cognitivo. Il dato anamnestico di una storia di apnee durante il sonno riferite dal partner è importante per la diagnosi. Ciononostante, l'OSAS è un disturbo eterogeneo, con una vasta gamma di sintomi notturni e diurni.

I sintomi notturni più frequenti e caratteristici di OSAS sono il russamento intermittente e l'interruzione del respiro, entrambi riferiti dal partner. Il russamento è il sintomo più comune (presente fino al 95% di tutti i pazienti)(20)ma è molto frequente anche nella popolazione generale adulta (presente nel 25-30% delle donne e nel 40-45% degli uomini tra i 41 e i 65 anni) (21). Tuttavia l'assenza del russamento rende l'OSAS improbabile, in quanto soltanto il 6% dei pazienti OSAS non russa (22). I pazienti con sospetta OSAS spesso riferiscono una lunga storia di russamento, che è diventato nel tempo sempre più intenso e irregolare, spesso associato all'aumento di peso corporeo, al consumo di alcolici o alla comparsa della menopausa.

Il partner spesso riferisce di aver osservato apnee del paziente durante il sonno, cioè pause respiratorie che interrompono il russamento mentre persistono sforzi respiratori, che si risolvono con respiri profondi e associati ad intenso russamento e/o movimenti corporei. Ciò costituisce causa frequente di consultazione medica, e le apnee osservate sono più predittive di OSAS rispetto

al russamento e alla sonnolenza diurna (23,24). Più raramente, il paziente riferisce risvegli con senso di soffocamento, che corrispondono ad "apnee percepite". La poliuria notturna, cioè la necessità di urinare ripetutamente durante la notte, è frequente (25) quanto aspecifica, soprattutto nell'età avanzata per la frequente coesistenza di ipertrofia prostatica o incontinenza urinaria. E' dovuta ad un'aumentata eliminazione di sali stimolata dal rilascio del peptide natriuretico atriale (26) o dalla depressione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (27). Questi cambiamenti ormonali si verificano come conseguenza della "pseudo-ipervolemia centrale" correlata alle modificazioni emodinamiche associate agli sforzi respiratori durante gli episodi apnoici. Altri possibili sintomi notturni associati all'OSAS sono diaforesi, sonno agitato o insonnia.

Tra i sintomi diurni, l'eccessiva sonnolenza diurna (EDS, excessive daytime sleepiness) è il più importante in quanto potenziale causa di incidenti stradali e sul lavoro. Sebbene le apnee nel sonno spesso causino EDS, questa non è utile per discriminare i pazienti con OSAS rispetto a quelli sani. Tra il 30 e il 50% della popolazione generale riferisce sonnolenza (3, 28), che è attribuibile nella maggior parte dei casi a sonno insufficiente. Inoltre diversi studi hanno evidenziato che il grado di sonnolenza non è strettamente correlato alla severità dell'OSAS (29,30). La gravità della sonnolenza può essere valutata soggettivamente per mezzo di alcuni questionari, come l'Epworth Sleepiness Scale (ESS). Il questionario ESS valuta la tendenza ad addormentarsi su una scala crescente di valori da 0 a 3 per otto diverse situazioni di vita quotidiana, i cui punteggi vengono sommati per ottenere uno

score indicativo della sonnolenza (31). Tra le maggiori cause di EDS, oltre all'OSAS occorre ricordare la privazione di sonno, la depressione, il diabete e l'obesità (32), condizioni frequenti e spesso associate all'OSAS.

Altri sintomi diurni sono: la stanchezza al risveglio, la sensazione di bocca secca al mattino, la nausea o la cefalea a risveglio, e la depressione.

In generale, i sintomi dell'OSAS si sviluppano nel corso degli anni e progrediscono con l'aumento di peso, con l'invecchiamento e l'ingresso in menopausa. Tuttavia, sintomi compatibili con OSAS, come ad esempio il russamento e la sonnolenza diurna, possono essere causati da patologie diverse dall'OSAS, come uno stile di vita povero, abitudini e/o disturbi patologici che possono predisporre un paziente a disturbi del sonno. Per tale motivo i dati clinici da soli hanno un valore limitato nell'identificazione dell'OSAS, e la diagnosi richiede la valutazione combinata delle caratteristiche cliniche insieme con un studio della respirazione durante il sonno (polisomnografia o monitoraggio cardio-respiratorio notturno) (20,23).

La polisomnografia (PSG) è il “gold standard” per la diagnosi delle patologie durante il sonno. Lo studio polisomnografico comporta generalmente almeno 12 canali di registrazione che includono l'elettroencefalogramma (EEG), l'elettrooculogramma (EOG), l'elettromiografia (EMG), il flusso aereo oro-nasale, i movimenti del torace e dell'addome, la posizione del corpo, un microfono per la registrazione del russamento, l'elettrocardiogramma (ECG), la pulso-ossimetria(33). La durata di una PSG dovrebbe essere di almeno 6 ore, anche se in caso di alta probabilità clinica di OSAS si possono eseguire studi “split-night”, nei quali la parte iniziale viene dedicata alla diagnosi e

quella finale alla titolazione della terapia ventilatoria. Tuttavia la PSG è costosa perché richiede adeguati laboratori del sonno e personale altamente specializzato.

Vista l'alta prevalenza della malattia, sono state sviluppate tecniche alternative di diagnosi. Il monitoraggio poligrafico cardio-respiratorio (PG) registra i segnali sopra descritti ad eccezione dell'EEG, dell'EMG e dell'EOG, ed è uno strumento diagnostico affidabile in pazienti con alta probabilità clinica di OSAS. Invece, la registrazione continua durante il sonno della saturazione ossiemoglobinica (SaO₂) è un metodo semplice ma insufficiente alla diagnosi di certezza, e non è attualmente raccomandato dalle attuali linee-guida.

Una task force dell'American Academy of Sleep Medicine(34) ha stabilito che per la diagnosi di OSAS, devono essere soddisfatti i seguenti criteri clinici A o B più il criterio strumentale C:

A) Eccessiva sonnolenza diurna non spiegata da altre condizioni

B) Due o più dei seguenti che non sono spiegati da altri fattori:

-soffocamento o gasping durante il sonno;

-ricorrenti risvegli;

-sonno non ristoratore;

-stanchezza diurna;

-difficoltà di concentrazione

C) La dimostrazione di 5 o più eventi ostruttivi durante monitoraggio notturno.

La Tabella 2 riporta le definizioni degli eventi respiratori elaborate dall'American Academy of Sleep Medicine Task Force (35).

Tabella 2: *Definizioni degli eventi respiratori nell'adulto (AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events, 2014)*³⁵

Eventi	Definizioni
Apnea Ostruttiva	Riduzione del flusso aereo > 90% rispetto ai valori basali pre-evento, associata a movimenti toraco-addominali normali o aumentati, di durata > 10 s
Apnea Centrale	Riduzione del flusso aereo > 90% rispetto ai valori basali pre-evento in assenza di movimenti toraco-addominali, di durata > 10 s
Apnea Mista	Riduzione del flusso aereo > 90% rispetto ai valori basali pre-evento, con assenza di movimenti toraco-addominali nella fase iniziale, seguita dalla ripresa degli sforzi respiratori nella seconda fase, di durata > 10s
Ipopnea	Riduzione del flusso aereo > 30% rispetto ai valori basali pre-evento, associata a una desaturazione di ossigeno > 3% o un arousal, di durata > 10 s Ipopnea ostruttiva: presenza di russamento, limitazione del flusso inspiratorio o movimenti toraco-addominali paradossi durante l'evento Ipopnea centrale: mancanza dei criteri elencati per l'ipopnea ostruttiva
Respiratory-related arousal (RERA)	Sequenza di respiri di durata > 10 s caratterizzati da crescente sforzo respiratorio o una consistente riduzione di ampiezza del segnale di flusso nasale con un appiattimento della forma d'onda (quando la sequenza di respiri non soddisfa i criteri per l'apnea o ipopnea)

Dal punto di vista clinico, l'OSAS viene classificata sulla base della frequenza di eventi respiratori nel sonno:

- OSAS lieve: AHI 5-15 eventi/ora di sonno
- OSAS moderata: AHI 15-30 eventi/per ora di sonno
- OSAS grave: AHI > 30 eventi/per ora di sonno

La modalità terapeutica più usata nell'OSAS e meglio studiata è la CPAP (pressione positiva della via aerea –Continuous Positive Airway Pressure) applicata per via nasale. La CPAP, titolata individualmente in ogni paziente, agisce stabilizzando le pareti orofaringee e mantenendo la pervietà delle vie aeree superiori (36), ma va applicata regolarmente ogni notte. Infatti, le apnee si ripresentano all'interruzione del trattamento con CPAP. E' sempre maggiore l'evidenza che l'applicazione della CPAP durante il sonno migliora la qualità e l'aspettativa di vita dei pazienti OSAS sintomatici, con riduzione dei costi sanitari associati alla morbidità cardiovascolare OSAS-correlata. Risulta anche ben documentato l'impatto sociale del trattamento in termini di riduzione del numero di ricoveri, del consumo di farmaci, di incidenti stradali, di assenteismo dal lavoro. Pertanto il mancato trattamento dell'OSAS comporta per la collettività costi elevati e comunque superiori a quelli necessari ad una corretta impostazione diagnostica e terapeutica.

2.3 OSAS e Rischio cardiovascolare

Numerosi studi epidemiologici e clinici hanno dimostrato l'associazione tra OSAS e malattie cardiovascolari come l'ipertensione arteriosa sistemica, scompenso cardiaco cronico, aritmie, cardiopatia ischemica e ictus cerebrale (37;38;39). La ventilazione con pressione positiva continua delle vie aeree (CPAP) previene l'ostruzione delle vie aeree superiori e tutte le sue conseguenze, incluse le desaturazioni notturne, normalizzando il rischio cardiovascolare in questi pazienti (40). I disturbi respiratori del sonno costituiscono un fattore di rischio cardiovascolare indipendente (41,3,37). Per esempio, Punjabi et al. (42) hanno dimostrato, nello SleepHeartHealthStudy, che gli eventi respiratori ostruttivi associati a desaturazione emoglobinica >4% sono associati a malattie cardiovascolari indipendentemente dai fattori di confondimento. La gravità dell'ipossiemia intermittente notturna è un importante fattore predittivo per la morbilità, soprattutto per quanto riguarda le conseguenze cardiovascolari dell'OSAS.

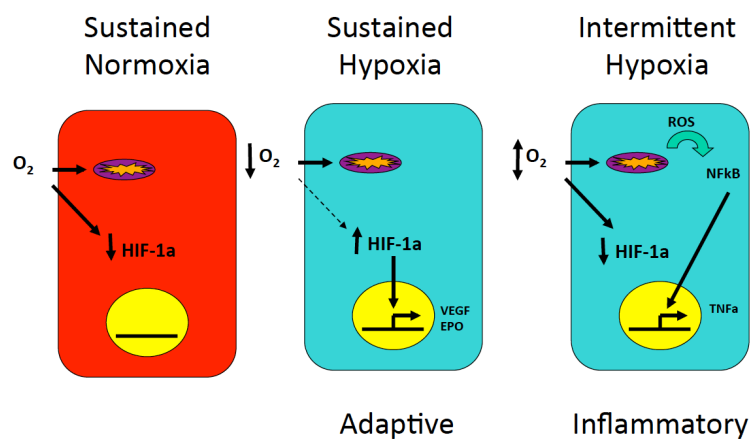
Ciò che rimane in gran parte da comprendere è il ruolo e la relativa importanza che i singoli meccanismi rivestono nel determinare lo sviluppo di patologie cardiocircolatorie. Sebbene infatti i meccanismi di danno intermedi che legano l'OSAS alle malattie cardiovascolari non siano completamente chiariti, è generalmente accettato che l'ipossia intermittente e la frammentazione del sonno giochino un ruolo chiave come "promoter" iniziali nella catena

eziopatogenetica di progressione dell'OSAS verso il danno cardiovascolare e metabolico.

IH, stress ossidativo e infiammazione

L'ipossia cellulare intermittente, caratterizzata da brevi cicli d'ipossia e riossigenazione, come tipicamente avviene nell'OSAS, può predisporre ad uno stress cellulare, mediato da alterazioni a livello mitocondriale, che comporta un aumento dei ROS. Tali eventi favoriscono l'attivazione di NFkB, un fattore di trascrizione che gioca un ruolo di primo piano nella cascata infiammatoria (Figura 1). Gli effetti a valle di questa attivazione includono il rilascio di fattori pro-aterogeni come il TNF α , che possono contribuire alla disfunzione endoteliale e alle complicanze cardiovascolari (43).

Figura 1. Rappresentazione schematica degli effetti dell'ipossia continua e intermittente a livello cellulare (Ryan et al, 2005)⁴³



Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono atomi o molecole con un elettrone spaiato nell'orbitale esterno, altamente instabili e inclini a reagire con altre molecole (44). Il più importante tra i ROS è l'anione superossido (O_2^-) generalmente prodotto dalla riduzione dell'ossigeno molecolare durante la respirazione cellulare. L'anione superossido è un radicale relativamente debole ma che può reagire con altre molecole e formare ROS più potenti e ossidanti come il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale ossidrilico (OH^\cdot) e i perossidi lipidici.

I ROS sono importanti segnali biologici prodotti anche durante il normale metabolismo aerobico. Diversi sistemi antiossidanti, altamente conservati in varie specie, contribuiscono a mantenere il normale stato di ossido-riduzione cellulare; lo stress ossidativo è quindi il risultato di uno squilibrio tra questi due sistemi.

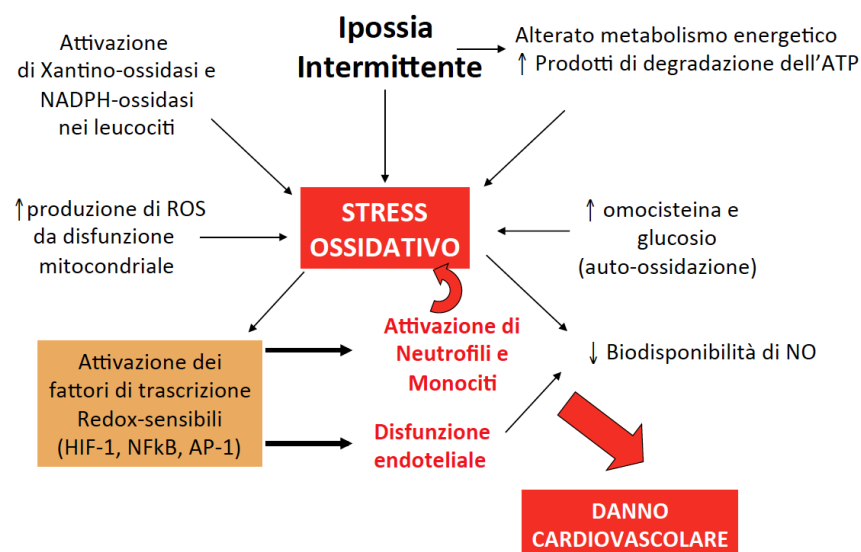
I rapporti tra ROS e insulto cardiovascolare sono stati chiariti da Granger e coll.(45) che hanno dimostrato in un modello sperimentale che l'anione superossido gioca un importante ruolo nel danno da ischemia-riperfusion. Analogamente, danno da radicali liberi si verificava nell'insulto da ischemia-riperfusion nell'infarto miocardico, nell'ictus e nel trapianto d'organi.

Per quanto riguarda l'OSAS, l'ipossia intermittente(IH) potrebbe essere considerata analoga al modello ischemia ripetuta e riperfusion (I/R) (46). I ROS possono danneggiare altre macromolecole come lipidi, proteine e DNA. In accordo con questa ipotesi, alcuni studi hanno riportato una correlazione

diretta tra AHI e perossidazione lipidica in soggetti con OSAS grave (47,48). Essendo la per ossidazione lipidica un marker surrogato di aterosclerosi e di mortalità cardiovascolare, i dati suggeriscono che la produzione di ROS associata all'ipossia intermittente contribuisca ai processi aterosclerotici dei pazienti con OSAS.

Nell'OSAS, l'eccessiva produzione di ROS può esercitare un ruolo patogenetico nella riduzione della funzione endoteliale, contribuendo ulteriormente ai processi aterosclerotici (49). Vari studi mostrano bassi livelli di ossido nitrico (NO) circolante nei pazienti con OSAS (50). I meccanismi proposti per spiegare come l'OSAS e l'ipossia intermittente portino a disfunzione endoteliale includono: l'interazione di NO e ROS con la formazione di perossinitrito, il disaccoppiamento della NO sintetasi endoteliale (e-NOS), la riduzione dei livelli endoteliali di e-NOS e l'aumento degli inibitori endogeni di e-NOS (figura 2)⁵¹

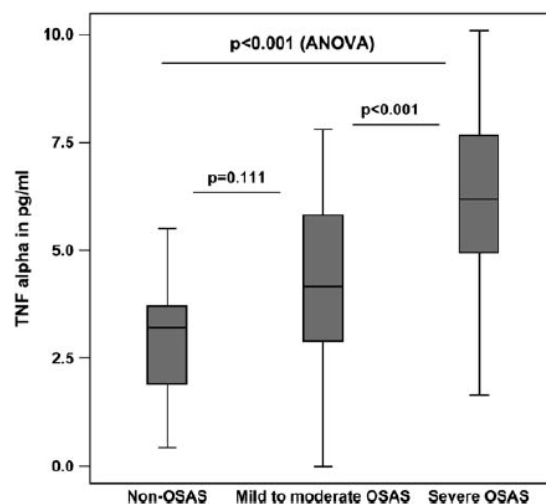
Figura 2. Meccanismi di stress ossidativo nell'OSAS⁵¹



I ROS, oltre ad essere un normale prodotto della catena respiratoria, sono regolatori del segnale di trasduzione e secondi messaggeri in molti pathway di segnale (52). In particolare i ROS sono implicati nella via delle MAPK che induce l'attivazione di vari fattori di trascrizione nucleare come NFkB, Ap1, HIF-1, SREBPs, GATA4(53,54).

Il fattore di trascrizione pro-infiammatorio NFkB è il principale interruttore coinvolto nella trascrizione di geni responsabili di infiammazione, sindrome metabolica, aterosclerosi (55,56). L'ipossia intermittente, sia in vitro in colture cellulari che nei topi, induce attivazione selettiva di NFkB. Nei pazienti OSAS, la concentrazione di NFkB nel sangue è aumentata proporzionalmente alla gravità dell'OSAS(Figura 3).⁵⁷

Figura 3. Aumento del TNF-alfa circolante nei pazienti OSAS (Ryan et al, 2006)⁵⁷



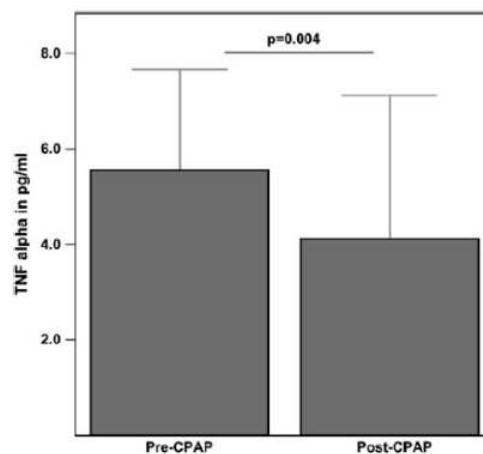
Le citochine attivate da NFkB partecipano alla modulazione della risposta infiammatoria, regolando l'attivazione macrofagica, modulando la proliferazione delle cellule muscolari lisce, la produzione di NO e l'attivazione

endoteliale. TNF- α e IL-6 sono delle più studiate citochine pro infiammatorie.

L'ipossia intermittente potrebbe intervenire anche nella patogenesi dell'infiammazione associata all'obesità, frequente nei pazienti OSAS. Sia i macrofagi che gli adipociti producono TNF- α e IL-6, che sono aumentati nei pazienti OSAS rispetto ai controlli, indipendentemente dal grado di obesità (58), e diminuiscono dopo trattamento con CPAP (figura 4)⁵⁷.

Figura 4. Riduzione del TNF- α circolante dopo terapia dell'OSAS con CPAP

(Ryan et al, 2006)⁵⁷



Il TNF- α induce stress ossidativo sull'endotelio, up-regola le molecole di adesione nelle cellule endoteliali e potenzia gli effetti del NFkB che a sua volta stimola la produzione di altre citochine.

La Proteina C Reattiva (PCR) è un marker di infiammazione prodotta dal fegato in risposta a IL-6. Sembra essere un indicatore importante di rischio cardiovascolare (59), e sindrome metabolica (60). L'associazione tra OSAS e PCR non è del tutto chiara, in particolare il rispettivo ruolo dell'OSAS e

dell'obesità nel determinare aumento della PCR. Alcuni studi che hanno confrontato uomini obesi con e senza OSAS hanno riscontrato che l'OSAS è associata ad aumento di PCR dopo correzione per il BMI (61). D'altra parte un recente studio di Ryan e coll. suggeriva che l'aumento della PCR era associato soprattutto all'obesità (62). Una recente meta-analisi ha mostrato una lieve riduzione di PCR dopo trattamento con CPAP (63).

Disfunzione endoteliale e alterazioni cardiovascolari nell'OSAS

Le cellule endoteliali, nello stato non attivato, resistono ad adesione da parte di leucociti, piastrine e globuli rossi. Tuttavia una lesione dell'endotelio, come da danno da ipossia e riossigenazione, può causare la loro attivazione con l'espressione di molecole di adesione(64,65). I pazienti OSAS presentano ridotta attività di eNOS, aumento di nitrotirosina, un marker di stress ossidativo (Figura 5), e riduzione della capacità di vasodilatazione dell'arteria brachiale, indicativa di disfunzione endoteliale (Figura 6); il trattamento con CPAP migliora lo stress ossidativo e la funzione endoteliale, indipendentemente dal grado di obesità dei pazienti(Figura 7)⁶⁶

Figura 5. *I pazienti OSAS mostrano ridotta e-NOS endoteliale, soprattutto nella forma attiva fosforilata, aumento di nitrotirosina e di NFkB, nei soggetti sia di peso normale (N), che sovrappeso (OV, overweight) e obesi (O).*

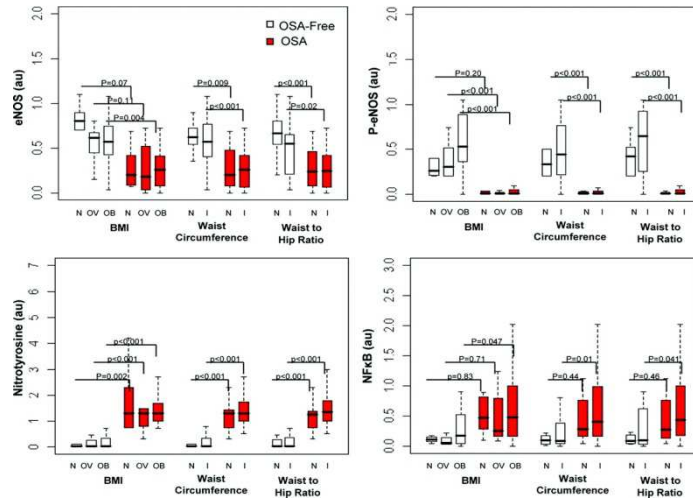


Figura 6. Tali alterazioni endoteliali sono associate a riduzione di vasodilatazione (FMD: flow-mediated dilation) in vivo

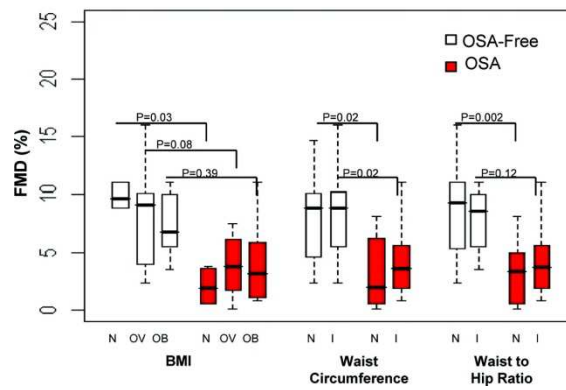
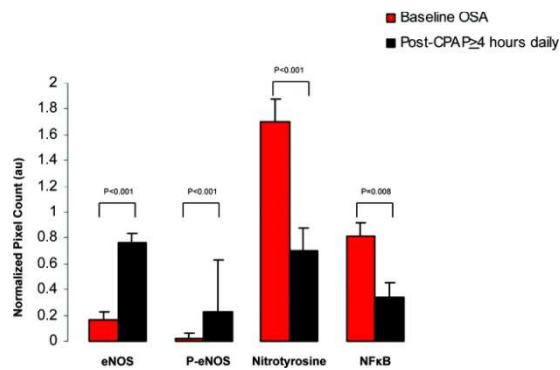


Figura 7. Il trattamento con CPAP migliorava lo stress ossidativo e la funzione endoteliale, indipendentemente dal grado di obesità dei pazienti⁶⁶



In sintesi, esiste una ricca letteratura sul ruolo dell'ipossia intermittente nella patogenesi dello stress ossidativo, dell'infiammazione, e del danno endoteliale. Questi meccanismi probabilmente intervengono nel determinare aumento del rischio cardiovascolare nei pazienti OSAS. Tuttavia, la frequente coesistenza di obesità, che è un potente fattore di rischio cardiovascolare, complica il quadro. Nel capitolo successivo discuteremo nel dettaglio il ruolo dell'obesità e delle alterazioni metaboliche dell'OSAS.

2.4 OSAS, obesità e sindrome metabolica

La sindrome metabolica (MetS), considerata espressione clinica dell'IR, è definita come una condizione caratterizzata dalla presenza di obesità viscerale o centrale, aumento della pressione arteriosa, iperglicemia, ipertrigliceridemia e bassi livelli di colesterolo HDL(67). Queste alterazioni costituiscono un cluster di fattori di rischio indicativo di alta probabilità di eventi cardiovascolari. La classificazione più utilizzata è quella derivata dallo studio epidemiologico NHANES-ATP III (per i soggetti Caucasici) (68):

- Circonferenza vita >102 cm nell'uomo e > 88 cm nelle donne;
- Pressione arteriosa \geq 130/85 mmHg oppure ipertensione in trattamento;
- Trigliceridi \geq 150 mg/dl;
- Colesterolo HDL \leq 40 mg /dl negli uomini e \leq 50 mg/dl nelle donne;
- Glicemia a digiuno \geq a 110 mg /dl.

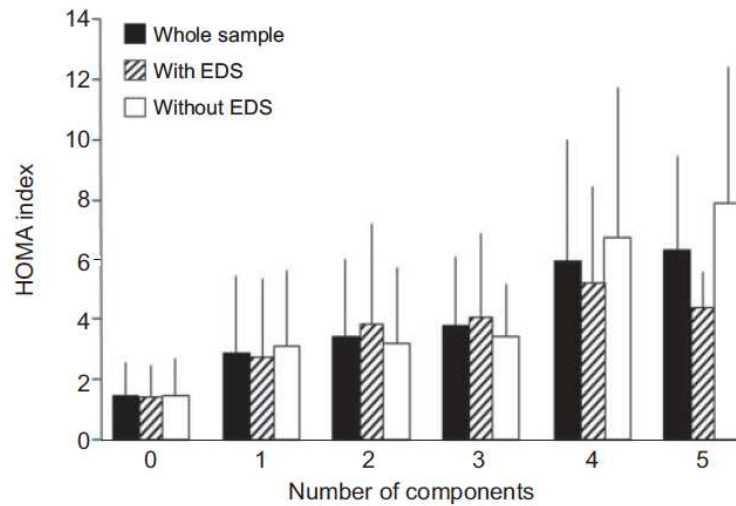
Vari studi trasversali, osservazionali e di popolazione, hanno dimostrato un'associazione tra OSAS e MetS(69-72). Inoltre, esiste una correlazione tra la

gravità delle due condizioni (73,74). Alcuni autori hanno proposto che l'OSAS dovrebbe essere considerata una componente aggiuntiva della MetS(75,76)tuttavia, i dati più recenti suggeriscono che l'OSAS possa contribuire al peggioramento delle anomalie metaboliche o potrebbe rappresentare un marcatore di severità della sindrome metabolica (77-79).

Insulino-resistenza e diabete sono solo alcune delle caratteristiche della Sindrome Metabolica che come già detto è caratterizzata dalla presenza di obesità, ipertensione e dislipidemia. Tali condizioni sono comuni anche nei soggetti con OSAS, per cui non sorprende la frequente coesistenza delle due condizioni. L'alta prevalenza di Sindrome Metabolica potrebbe da sola giustificare l'aumentato rischio cardiovascolare nei pazienti con OSAS, ma diversi studi suggeriscono che l'OSAS eserciti un effetto indipendente e aggravi il quadro metabolico.

Se si considerano singolarmente le variabili che definiscono la Sindrome Metabolica, gli studi disponibili evidenziano differenze significative tra i pazienti con OSAS ed i soggetti di controllo. Alcune componenti della Sindrome Metabolica (in particolare, l'aumento della circonferenza vita, della pressione diastolica e della glicemia a digiuno) sembrano essere più frequenti di altre nei pazienti OSAS rispetto ai controlli (73). L'insulino-resistenza è correlata al numero dei fattori della Sindrome Metabolica nei pazienti con OSAS (Figura 8) (80) e tale numero aumenta con la gravità dell'OSAS (81).

Figura 8. *Correlazione tra numero dei fattori della Sindrome Metabolica e insulino-resistenza nei pazienti con OSAS*⁸⁰



Resta ancora da chiarire se l'OSAS favorisca l'insorgenza della Sindrome Metabolica o ne rappresenti semplicemente una manifestazione. Tutte le singole componenti che definiscono la Sindrome Metabolica, infatti sono in genere associate all'OSAS. L'obesità addominale, è un fattore di rischio per OSAS ed è spesso associata ad una maggiore circonferenza del collo e a maggiore gravità dei disturbi respiratori nel sonno. Nello stesso tempo, l'obesità è una componente importante della Sindrome Metabolica. In tutti gli studi che hanno valutato la relazione tra OSAS e Sindrome Metabolica, gli indici di obesità centrale erano presenti in circa il 90% dei soggetti con OSAS contro il 50% dei soggetti di controllo, ed i soggetti con OSAS grave presentavano una circonferenza della vita più ampia. L'obesità pertanto, da un lato potrebbe spiegare la relazione tra l'OSAS e la Sindrome Metabolica, dall'altro potrebbe rappresentare un fattore confondente per una corretta interpretazione del legame tra le due malattie.

IH e insulino-resistenza

Oltre agli effetti dell'obesità, lo sviluppo di IR e dell'alterato metabolismo glucidico possono essere patogeneticamente collegati sia alla frammentazione del sonno che all'ipossia cronica intermittente tipiche dell'OSAS. A causa delle apnee, il paziente OSAS ha un sonno frammentato e trascorre meno tempo nel sonno profondo ad onde lente rispetto al soggetto normale. Quando volontari sani sono risvegliati dal sonno con stimoli acustici o meccanici essi mostrano diminuita sensibilità all'insulina e aumento dei livelli di cortisolo e dell'attività simpatica al mattino(82). Tasalie colleghi hanno dimostrato risultati qualitativa mente simili con l'interruzione selettiva del sonno a onde lente, e la frequenza di tali interruzioni era correlata alla gravità del deficit della sensibilità all'insulina (83).

Anche l'ipossia intermittente può causare insulino-resistenza (84-87). Modelli murini di OSA in cui gli animali erano esposti a ipossia intermittente hanno dimostrato la comparsa di intolleranza al glucosio e insufficiente secrezione di insulina, secondaria al rilascio di ROS (88), aumento del tono simpatico (89), rilascio di mediatori infiammatori (43), e apoptosi delle cellule beta del pancreas (90,91). Tuttavia, l'esposizione all'ipossia intermittente nei topi induce anche frammentazione del sonno (92), confermando l'interconnessione tra le due caratteristiche distintive dell'OSAS.

In soggetti normali esposti ad una miscela di gas ipossica, per riprodurre il profilo di desaturazione di O₂ dei pazienti OSAS, è stata dimostrata una

riduzione della sensibilità all'insulina in accordo ai dati sperimentali ottenuti nei topi (93).

Diversi meccanismi causali potrebbero spiegare gli effetti dell'ipossia intermittente sul metabolismo del glucosio:

a) Attivazione del sistema nervoso simpatico: le catecolamine sono note per diminuire la sensibilità all'insulina e ridurre l'assorbimento del glucosio insulino-mediato. Infatti, la somministrazione di adrenalina a volontari sani diminuisce la sintesi del glicogeno, aumenta la glicolisi, e diminuisce la capacità del glucosio di stimolare la propria dismissione(94,95). Nonostante la forte evidenza di un ruolo potenziale per il sistema nervoso simpatico nel metabolismo del glucosio, Iyori et al. (96) hanno dimostrato che il blocco di attività del sistema autonomo non attenua gli effetti negativi dell'ipossia intermittente sulla sensibilità all'insulina;

b) alterazione delle funzioni corticotrope: il soggiorno ad alta quota o l'ipossia ipobarica modificano la funzione ipotalamo-ipofisi-surrenalica (HPA) e aumentano il cortisolo circolante(97,98). Il cortisolo aumenta la gluconeogenesi epatica, inibisce la secrezione di insulina pancreatica, e induce insulino-resistenza (99,100). In studi su volontari sani esposti ad ipossia intermittente però i livelli di cortisolo risultavano immutati(93). Pertanto, l'ipossia intermittente potrebbe non modificare l'asseHPA; in alternativa, la durata dell'esposizione all'ipossia intermittente in questi studi potrebbe essere stata insufficiente per una risposta rilevabile;

c) aumentata sintesi di specie reattive dell'ossigeno, che possono sopprimere la secrezione di insulina e peggiorare la sensibilità all'insulina (101,102);

d) rilascio di citochine pro-infiammatorie, come IL-6 e ilTNF- α : entrambe queste citochine sono causalmente implicate nella patogenesi di insulino-resistenza e diabete di tipo 2 (103-105). Sebbene i meccanismi sopra descritti possano agire sinergicamente con l'ipossia intermittente o l'apnea ostruttiva del sonno nell'alterare il metabolismo del glucosio, è evidente che la nostra comprensione dei percorsi intermedi è ancora incompleta.

Una relazione causale tra OSAS ed insulino-resistenza implica che il trattamento dell'OSAS dovrebbe migliorare il quadro metabolico.

Anche in questo caso, però gli studi sugli effetti della terapia dell'OSAS sull'insulino-resistenza hanno dato risultati discordanti (Tabella 3).

Tabella 3. *Studi che mostrano gli effetti della CPAP sull'insulino-resistenza*

Insulino resistenza: studi clinici	
Associazione con OSAS	Associazione con BMI
Strohl et al. 1994	Barceló et al. 2004
Vgontzas et al. 2000	Gruber et al. 2006
Ip et al, 2002	Sharma et al. 2007
Tassone et al. 2003	Otake et al. 2009
Meslier et al. 2003	
Makino et al. 2006	
Sulit et al. 2006	
McArdle et al. 2007	
Kono et al. 2007	
Papanas et al. 2009	
Botros et al. 2009	

L'applicazione acuta della CPAP per una notte non migliora la funzione insulinica (106), ed uno studio ha evidenziato addirittura un aumento della glicemia dopo CPAP acuta in pazienti OSAS obesi non diabetici (107). I risultati ottenuti dopo almeno 3 mesi di terapia con CPAP sono ugualmente variabili. Sebbene alcuni studi evidenzino un miglioramento dell'insulino-resistenza, specie nei soggetti che al momento della diagnosi di OSAS avevano già un alterato metabolismo glucidico (107,108), la maggior parte degli studi non ha documentato un effetto significativo della CPAP sulla glicemia o l'insulino-resistenza (109-113). Tale variabilità dei risultati potrebbe essere almeno in parte spiegata dai diversi metodi utilizzati per la misurazione della glicemia e dell'insulino-resistenza, con più frequenti risultati positivi negli studi che hanno utilizzato il clamp euglicemico o la misura diretta dei livelli glicemici tissutali rispetto agli studi basati su metodologie meno raffinate. Inoltre, gli studi a favore dell'effetto positivo del trattamento con CPAP consideravano generalmente soggetti con obesità più grave rispetto agli studi che riportavano dati negativi sugli effetti del trattamento.

IH e obesità

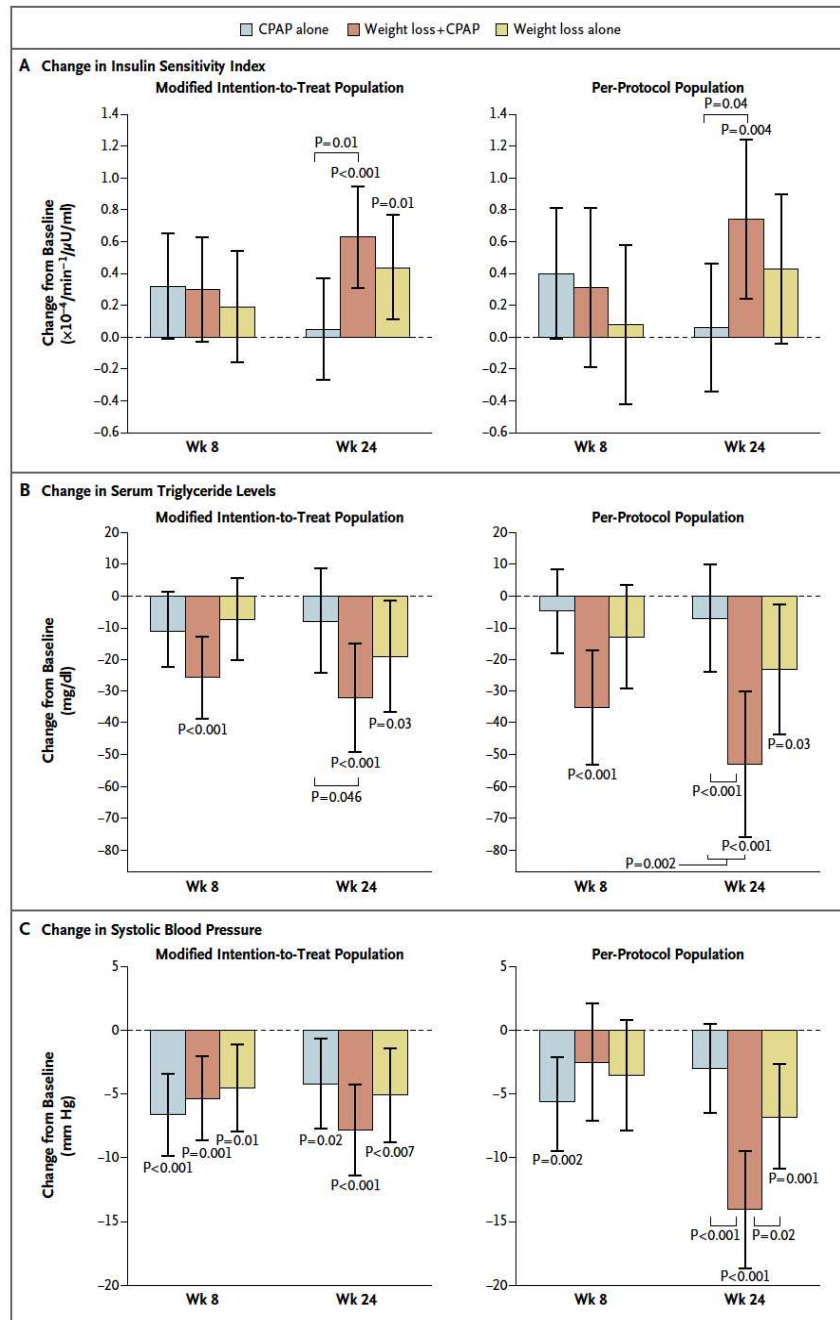
L'OSAS e l'obesità sono spesso associate, la qual cosa ha reso difficile capire quanto ciascuna delle due possa fungere da causa per la comparsa di disordini infiammatori, metabolici e ipertensione arteriosa, così frequenti nei pazienti con OSA. Molti degli studi che hanno identificato la perdita di peso come fattore protettivo da alterazioni cardiovascolari e metaboliche non

avrebbero preso in considerazione nei campioni di soggetti studiati la possibile presenza e l'eventuale influenza dell'OSA e del suo miglioramento col dimagrimento. Allo stesso modo, molti studi sugli effetti del trattamento dell'OSA con CPAP hanno mostrato di migliorare il profilo cardiovascolare e metabolico, ma non sempre avrebbero preso in adeguata considerazione i possibili effetti confondenti di un sovrappeso o delle sue variazioni.

Nello studio di Chirinos JA et al (114) sono stati messi a confronto gli effetti di tre diverse strategie terapeutiche dell'OSA: sola CPAP, solo dimagrimento, CPAP e dimagrimento combinati (figura 9). Ciascun paziente è stato seguito molto frequentemente, in modo da ottenere una buona compliance. L'effetto primario ricercato è stato quello sui livelli di proteina C reattiva (PCR); come effetto secondario (da interpretare con cautela per la possibilità di errori statistici di tipo I) sono state considerate variazioni della sensibilità all'insulina e dell'assetto lipidico; come effetto esplorativo variazioni della pressione arteriosa. Gli effetti sono stati valutati dopo 8 e dopo 24 settimane di trattamento. Alla 24a settimana, nei pazienti sottoposti a solo dimagrimento o a terapia combinata, diversamente da quelli trattati con sola CPAP, la sensibilità all'insulina era aumentata mentre la PCR e i trigliceridi erano diminuiti significativamente: l'entità di tutte queste variazioni era significativamente diversa solo tra il gruppo sottoposto a sola CPAP e ciascuno degli altri due gruppi. Variazioni minori sono state osservate su colesterolo HDL e colesterolo LDL. La pressione arteriosa sistolica e la media erano diminuite significativamente in tutti e tre i gruppi, ma le variazioni erano più pronunciate nel gruppo sottoposto a terapia combinata. Il lavoro suggerisce un ruolo importante dell'obesità nella genesi dei disturbi

infiammatori e metabolici nell'OSA, mostrando che nell'OSA associata ad obesità trattare l'eccesso ponderale migliora i disturbi metabolici ed almeno alcuni indici infiammatori molto più di quanto non faccia la CPAP. Poiché il dimagrimento comporta una certa riduzione dei disturbi respiratori nel sonno, per quanto di entità variabile da soggetto a soggetto, non si può escludere che il suo effetto possa anche essere stato determinato da una diminuzione della gravità dell'OSA. Poiché i risultati della terapia combinata erano maggiori rispetto a quella con sola CPAP, esso dimostra un effetto del dimagrimento indipendente da quello del miglioramento dell'OSAS.

Figura 9. Miglioramento delle variabili metaboliche in pazienti OSAS dopo trattamento con sola CPAP o con CPAP e dimagrimento o solo dimagrimento¹¹⁴



Ormai i dati in letteratura sull'infiammazione e il metabolismo nell'OSA sono numerosi, nonostante molti studi siano basati su piccoli numeri, e non sempre su disegni molto rigorosi. I risultati pubblicati finora sono contraddittori ma, diversamente da quanto indicherebbe questo lavoro, alcune metanalisi supportano un'influenza dell'OSA sui livelli di PCR e sul metabolismo glucidico e lipidico (115-117). Comunque, l'indicazione pratica che il lavoro fornisce è che per ottenere un effetto clinicamente significativo sui fattori dell'infiammazione e sui disturbi metabolici dei pazienti con OSA obesi, vale sicuramente la pena trattare l'obesità oltre alle apnee. Di questo va tenuto conto nella gestione dei pazienti in cui diagnosticiamo disturbi respiratori nel sonno.

3. OSAS ed alterazioni epatiche (*Non alcoholic Fatty Liver Disease-NAFLD*)

3.1 NAFLD: definizione

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD), entità clinico-istopatologica descritta per la prima nel 1980 (118), si caratterizza per la presenza di steatosi epatica in soggetti con anamnesi negativa comunque modesta per assunzione alcolica. Il limite alcolico imputabile di danno epatico è variabile in base a sesso, età e razza; è stato comunque definito un limite di 20 gr/die (in alcune classificazioni si differenzia in 30 gr/die per i maschi e 20 gr/die per le femmine) (119). Le alterazioni anatomopatologiche della NAFLD sono simili a quelle indotte dall'abuso alcolico e possono spaziare dalla semplice steatosi, alla steatosi con elementi necro-infiammatori (steatoepatite, NASH), alla fibrosi avanzata fino alla cirrosi e al carcinoma epatocellulare (120-122). La steatosi lieve coinvolge meno del 30% degli epatociti, mentre la steatosi severa coinvolge oltre il 60% degli epatociti (123). La Steatosi epatica può evolvere in steatoepatite non alcolica (NASH), che ha una prevalenza del 2-3% nei soggetti magri (124), ma può raggiungere circa il 20% negli obesi e il 50% nei pazienti patologicamente obesi (125).

Per steatosi epatica si intende l'accumulo di lipidi, generalmente costituiti da trigliceridi, all'interno dell'epatocita; l'accumulo viene considerato non patologico se inferiore al 5% del peso del fegato (126). La steatosi è generalmente causata da una serie di alterazioni del metabolismo lipidico su base tossica, dismetabolica, nutrizionale o ereditaria; bisogna distinguere quindi queste forme secondarie dalla forma primitiva (NAFLD propriamente detta) (Tabella 4).

Tabella 4. *Classificazione eziologica della NAFLD*

CLASSIFICAZIONE EZIOLOGICA	ASSOCIAZIONI
NAFLD primaria	Obesità, diabete mellito tipo 2, dislipidemia, ipertensione
NAFLD secondaria	Farmaci: corticosteroidi, estrogeni, amiodarone, tamoxifene, calcio-antagonisti, methotrexate, acido valproico
	Virus: HCV, HIV
	Tossici: solventi, funghi tossici
	Nutrizionale: bypass digiuno-ileale, resezione intestinale, nutrizione parenterale totale, rapido calo ponderale
	Metabolica: lipodistrofia, ipobetalipoproteinemia, ipopituitarismo, sdrReye, steatosi acuta della gravidanza

La NAFLD primitiva è frequentemente associata ad obesità (prevalentemente viscerale), diabete e dislipidemia, ed è correlata a marcatori clinici e biologici di insulino-resistenza. C'è quindi una forte associazione con la sindrome metabolica ed essa può essere considerata tra le manifestazioni cliniche della sindrome stessa (127).

Le implicazioni cliniche della NAFLD derivano soprattutto dal suo potenziale di progressione verso l'insufficienza epatica, mentre la steatosi

isolata ha una prognosi relativamente benigna nella maggior parte dei pazienti.

3.2 NAFLD: epidemiologia

La reale prevalenza della NAFLD non è nota per la mancanza di test diagnostici specifici e sensibili utilizzabili su larga scala. Le stime di prevalenza vengono infatti dedotte da criteri indiretti quali rialzo delle transaminasi e steatosi epatica all'ecografia.

Studi epidemiologici hanno identificato la NAFLD come un problema sanitario emergente in tutto il mondo con una prevalenza stimata del 20-40% nei paesi occidentali. (121,124,128).

La NAFLD è presente in tutte le razze e le fasce d'età. Uno studio cinese ha rilevato che nelle fasce d'età < 50 anni la prevalenza di NAFLD nelle donne è circa la metà che negli uomini per probabile effetto protettivo degli estrogeni, dopo la menopausa aumenta la prevalenza superando anche quella dei maschi (129).

La probabilità di sviluppare la NAFLD aumenta notevolmente con il BMI. (130). Infatti nei pazienti obesi si ha una prevalenza del 57%-74%, mentre nella popolazione generale è del 10%-24% (131). In uno studio italiano è stato evidenziato che la prevalenza di NAFLD, diagnosticata con l'ecografia, varia dal 16% in soggetti con BMI < 25 kg/m², al 76% in soggetti obesi con BMI > 30 kg/m² (132). Nelle casistiche di chirurgia bariatrica i soggetti presentano una prevalenza di NAFLD del 96% (133). Aumenta inoltre in relazione ai

gradi di iperglicemia: 27% (glicemia a digiuno < 110 mg/dl), 43% (glicemia a digiuno 110-126 mg/dl), 62% (glicemia a digiuno > 126 mg/dl, in diabete di nuova diagnosi) (134). Inoltre, l'associazione tra diabete ed obesità pone un rischio ulteriore: tra i pazienti con obesità severa e diabete, il 100% ha almeno una lieve steatosi, il 50% ha steatoepatite ed il 19% ha cirrosi (135).

La prevalenza della NAFLD è in aumento perché sono in aumento alcuni fattori di rischio importanti come il diabete di tipo 2 e l'obesità. Ad esempio in uno studio giapponese che considerava una popolazione di 39000 persone circa con diverse cause di epatopatia, la prevalenza di steatosi epatica all'ecografia è aumentata dal 12,6% nel 1989, al 28,4 % nel 1998, fino al 30,4% nel 2000 (136). Infine, più recentemente Targhered al. (137) hanno riscontrato che in una popolazione di diabetici di tipo 2 (3166 pazienti) solo il 14,7% non presenta steatosi alla diagnosi ecografica, la maggioranza invece (2421 pazienti) ha una qualche anomalia ecografia o elevati enzimi epatici. Di questi 2421 pazienti, il 12,6% abusa di alcool (>20 g/die), il 3,1% soffre di altre epatopatie croniche (virali, da farmaci ecc) e ben il 69,5% è affetto da NAFLD.

La NAFLD è associata ad un aumentato rischio di mortalità per malattie cardiovascolari (CVD), indipendentemente dall'età, dal sesso, dai livelli di colesterolo-LDL e dal fumo (138).

3.3 NAFLD: fisiopatologia

Sebbene il meccanismo patogenetico della NAFLD non sia stato ancora del tutto chiarito, l'insulino-resistenza sembra svolgere un ruolo chiave

nell'innescare una serie di eventi metabolici che portano da una parte alla comparsa di steatosi epatica e dall'altra facilitano la progressione in steatoepatite. La steatosi di per sé non è una condizione maligna con tendenza verso quadri epatici più avanzati, ma con essa entrano in gioco altri meccanismi patogenetici, alla cui base è la perossidazione lipidica. Lo sviluppo di steatoepatite è stato quindi proposto come un processo a due stadi ("two-hit") cioè accanto ad una degenerazione grassa del fegato (primo colpo) ci deve essere un altro insulto ossidativo (secondo colpo) per far progredire la semplice steatosi in NASH. (139). Il deposito di ferro a livello epatico, la leptina, la sovracrescita batterica ed il calo delle difese anti-ossidanti sono stati studiati come possibili agenti ossidativi.

Ruolo dell'insulino - resistenza

L'insulino-resistenza indotta da vari possibili fattori come l'obesità, il diabete e l'iperlipidemia può portare alla deposizione di trigliceridi nel citoplasma degli epatociti ed evolvere in steatosi epatica ("first hit"). La progressione verso la steatoepatite non è un evento obbligato, ma dipende dal "second hit" o "secondo colpo", consistente in un evento che causa stress ossidativo e perossidazione lipidica che supera i normali meccanismi di difesa cellulare; a ciò segue necroinfiammazione e steatoepatite.

L'insulino-resistenza è raramente causata da una condizione genetica, indipendente dall'obesità. Più spesso si tratta di una condizione acquisita legata all'aumento del grasso viscerale, generata da stili di vita sedentari e da eccessivo apporto calorico. È verosimile che le due componenti (congenita e acquisita)

abbiano nei vari casi un peso diverso; lo stile di vita condurrebbe così alla manifestazione fenotipica di genotipi a rischio.

L'insulino-resistenza induce cambiamenti importanti nel metabolismo lipidico quali un aumento della lipolisi periferica, aumentata sintesi di trigliceridi e aumentata captazione (uptake) di acidi grassi da parte del fegato (140). Tutte queste condizioni contribuiscono all'accumulo di trigliceridi nell'epatocita. I trigliceridi derivano dagli acidi grassi accumulati nel tessuto adiposo e dalla lipogenesi de novo che avviene a livello epatico. Normalmente, gli acidi grassi vengono esterificati a livello epatico in trigliceridi, alcuni dei quali sono poi trasportati fuori dagli epatociti come very-low-densitylipoproteins (VLDL). L'aumento dei livelli di lipidi (in particolare sotto forma di trigliceridi) all'interno delle cellule epatiche di pazienti con NAFLD risulta da uno squilibrio tra gli enzimi che promuovono l'entrata e la sintesi di acidi grassi e quelli che promuovono l'ossidazione e l'uscita degli acidi grassi (135). L'insulino-resistenza (stimolata da TNF α , Rad, PC-1, leptina e acidi grassi) porta ad un accumulo di grasso nel fegato con due sistemi: la lipolisi e l'iperinsulinemia. La lipolisi induce un aumento della quantità di acidi grassi liberi nel sangue provenienti dal tessuto adiposo e di conseguenza un aumento dell'uptake epatico di acidi grassi. L'aumento degli acidi grassi a livello degli epatociti porta ad uno shift tra l'ossidazione dei carboidrati e la β -ossidazione degli acidi grassi, una saturazione della β -ossidazione comporta un accumulo intraepatico di grasso. Gli acidi grassi sono inoltre substrati e induttori dei citocromi P450 (in particolare 2E1 e 4A). Quest'ultimo tende ad essere elevato nei pazienti con NAFLD e porta ad un aumento dei radicali liberi dell'ossigeno capaci di indurre

la per ossidazione dei lipidi di membrana. L'iperinsulinemia (secondaria all'insulino-resistenza) induce a livello epatico un aumento della glicolisi e successiva conversione dei carboidrati in FFA (trigliceridi) e favorisce l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti in quanto porta ad una aumentata distruzione della proteina B-100, essenziale per la costituzione delle VLDL.

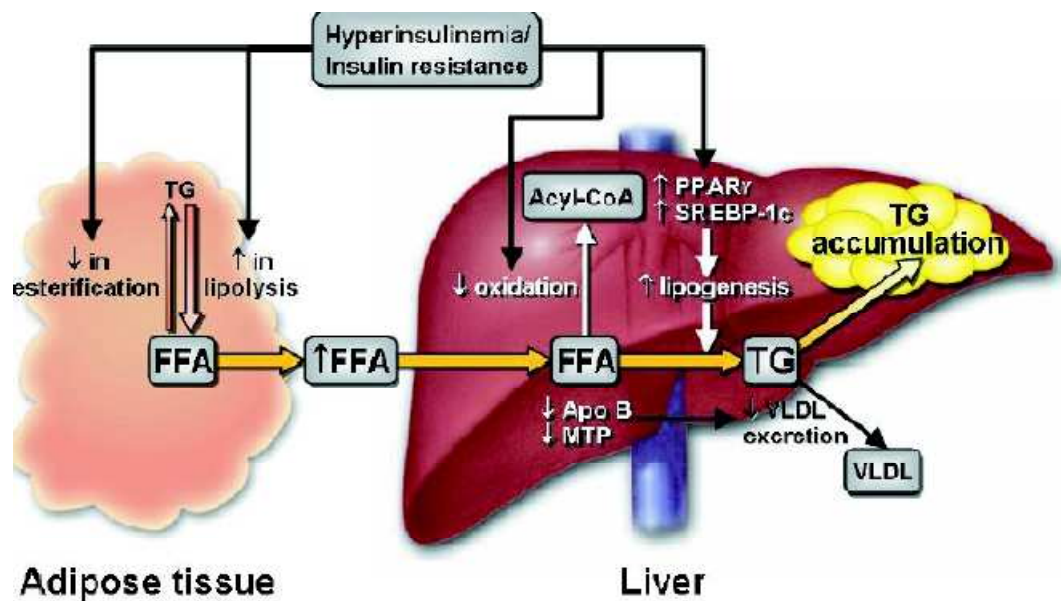


Figura 10. Ruolo dell'insulino-resistenza nella steatosi epatica. L'insulino-resistenza a livello del tessuto adiposo stimola la lipolisi e inibisce l'esterificazione degli acidi grassi liberi (FFA), questo determina un'aumentata concentrazione sierica di FFA che vengono captati dal fegato e utilizzati per la sintesi di trigliceridi. L'iper-accumulo di trigliceridi nel fegato è secondario all'aumentato afflusso di FFA e all'iper-espressione di fattori di trascrizione lipogenici (PPAR γ -peroxisom eproliferator-activated receptor gamma e SREBP1c-sterol regulatory element binding protein). L'iperinsulinismo inoltre inibisce l'ossidazione degli FFA e lo smaltimento dei trigliceridi sotto forma di VLDL per ridotta sintesi di apo B o ridotta incorporazione di trigliceridi con apo B da parte di MTP-microsomal triglyceride transfer protein. (tratto da Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholicfatty liverdisease. CMAJ. 2005;172(7):899-905)¹⁴⁰

Ruolo dello stress ossidativo

L'accumulo di grasso negli epatociti provoca saturazione della β -ossidazione mitocondriale (l'iperinsulinemia stessa è in grado di bloccare la β -ossidazione mitocondriale). Quindi se c'è un aumentato afflusso di acidi grassi diventano importanti i sistemi extra-mitocondriali di ossidazione: β -ossidazione perossisomiale (in genere deputata all'ossidazione di acidi grassi a catena molto lunga) e la ω -ossidazione microsomiale (ad opera degli enzimi 2E1 e 4 del citocromo P450 con produzione di acidi grassi dicarbossilici particolarmente tossici per la cellula); entrambe determinano la liberazione di H₂O₂ ed altre specie reattive dell'ossigeno. Le lipossigenasiperossisomiali e microsomiali di questi processi extramitocondriali sono regolate da particolari recettori cellulari PPAR- α (dopo il loro legame con gli Acil-CoA non metabolizzati).

L'accumulo intraepatocitario di acidi grassi rappresenta una fonte di stress ossidativo responsabile dell'evoluzione da semplice steatosi alla steatoepatite e alla cirrosi. Quando le specie reattive dell'ossigeno superano le capacità difensive dei sistemi antiossidanti possono indurre steatoepatite e fibrosi tramite perossidazione lipidica e induzione di citochine. L'iperproduzione di specie reattive può indurre danno a livello mitocondriale (danno al DNA, alle proteine ed alle membrane costitutive) con alterazione della produzione cellulare di ATP e rilascio ulteriore di metaboliti reattivi dell'ossigeno. La perossidazione lipidica delle membrane cellulari provoca necrosi cellulare, formazione della sostanza ialina di Malloryed attivazione delle cellule epatiche stellate che sintetizzano collagene. Lo stress ossidativo induce la formazione di citochine come il TNF α , TGF β e IL8 da parte di epatociti, cellule di Kupffer e adipociti. Queste citochine

provocano apoptosi, chemiotassi leucocitaria, fenomeni di flogosi locale con ulteriore danno alla catena respiratoria mitocondriale. I mitocondri in corso di steatoepatite presentano danni ultrastrutturali con inclusioni paracristalline e megamitocondri. I mitocondri sono strutture intracellulari fondamentali per il metabolismo che servono per la produzione di energia della cellula. È stato dimostrato che anomalie mitocondriali sono fortemente legate alla patogenesi della NAFLD e tali dati supportano la teoria che la NAFLD sia una malattia mitocondriale (141). La disfunzione mitocondriale però non è solo causa di accumulo di grasso a livello epatico, ma porta anche alla generazione di ROS e di citochine che contribuiscono alla progressione della NAFLD inducendo infiammazione e fibrosi epatica (142).

Ruolo delle adipochine e delle citochine infiammatorie

Il tessuto adiposo è un organo endocrino attivo che secreta le adipochine che sembrano avere un ruolo importante come legame patogenetico tra obesità, insulino-resistenza e steatosi epatica. Il ruolo delle adipochine e delle citochine sembra centrale inoltre nella progressione della steatosi, verosimilmente mediata dallo stress ossidativo.

L'*adiponectina* è un ormone prodotto esclusivamente dal tessuto adiposo con effetti positivi sul metabolismo lipidico in quanto aumenta sia l'entrata dei lipidi all'interno delle cellule sia la β -ossidazione a livello muscolare. Inoltre ha effetti anti-infiammatori in quanto inibisce la produzione del TNF- α a livello epatico e di citochine dell'infiammazione (interleuchina-6) da parte del tessuto adiposo. L'*adiponectina* gioca un ruolo nella modulazione dell'insulino-

sensibilità ed è pertanto ridotta in caso di insulino-resistenza e obesità (143). In topi ob/ob infatti la somministrazione di adiponectina riduce la steatosi e la fibrosi a livello epatico (144). Ridotti livelli di adiponectina correlano con la severità dell'istologia in pazienti con NASH (145), l'ipoadiponectinemia è infatti associata con una necro-infiammazione più estesa (146) e con il grado di fibrosi (147). Anche l'espressione intraepatica dei recettori dell'adiponectina (che agiscono con azione autocrina o paracrina) è inversamente correlata alla necro-infiammazione.

La *leptina* è una citochina infiammatoria prodotta dagli adipociti, considerata fondamentale nella regolazione del peso in quanto capace di azione soppressiva dell'appetito a livello ipotalamico (148). La leptina circolante esiste sia in forma libera che legata a proteine, e la quantità libera riflette il totale accumulo energetico nel tessuto adiposo, aumentando esponenzialmente con l'aumento della massa (149). La produzione di leptina dagli adipociti è regolata da diversi fattori: l'insulina e i glucocorticoidi agiscono direttamente sugli adipociti per aumentare la produzione di leptina, e l'iperinsulinemia cronica come l'aumentato turnover cortisonico possono essere alla base della iperleptinemia osservata nell'obesità (150). D'altro canto le catecolamine circolanti sono in grado di ridurre la produzione di leptina dagli adipociti e forse questo spiega, almeno parzialmente, il ritmo circadiano della leptina (maggiore di notte che di giorno) e l'influenza del sonno che è associato con un aumento della leptinemia nei soggetti normali (151).

I livelli plasmatici di leptina rispondono anche alle variazioni di bilancio energetico nel breve periodo, con aumento nei periodi di iperalimentazione e

diminuzione nei periodi di dieta (152). La leptina attiva specifici recettori a livello cerebrale, ma soprattutto a livello ipotalamico (153) dove in particolare inibisce l'espressione del neuropeptide Y (NPY) che è un potente stimolatore dell'appetito e attivatore dell'asse ipotalamo-ipofisario-gonadico. La "downregulation" del NPY è associata con la soppressione dell'appetito, con l'aumento di attività di scarica autonoma simpatica, e con l'aumento del metabolismo energetico (154). La carenza genetica di leptina provoca obesità, come nel modello animale del topo ob/ob o privo del recettore della leptina (LEPR-). Tuttavia l'assenza di leptina è raramente causa di obesità nell'uomo, e i livelli di leptina sono più elevati negli obesi che nei controlli normopeso. Pertanto, l'obesità umana rappresenta generalmente uno stato di leptino-resistenza (155).

Il metabolismo della leptina è in relazione con la secrezione e l'azione dell'insulina; spesso vi è resistenza all'azione sia dell'insulina sia della leptina che comporta accumulo di trigliceridi a livello epatico. L'infusione di leptina nei topi riduce il grasso viscerale e l'accumulo di trigliceridi, promuove l'azione insulinica a livello epatico senza interferire con la concentrazione di FFA e con la captazione periferica del glucosio (156). Questi effetti benefici non dipendono solamente dall'aumento dell'insulino-sensibilità, ma anche dall'azione della leptina in sé. Alti valori di leptina sono stati riscontrati in pazienti con NAFLD, sia obesi sia normopeso (157). L'iperleptinemia che si riscontra nei pazienti con NAFLD sembra secondaria alla leptino-resistenza nei tessuti periferici (158) con conseguente deposito di grassi nel fegato e insorgenza di steatosi epatica. È stato dimostrato inoltre che la leptina potrebbe avere un effetto profibrogenico a

livello dei sinusoidi favorendo la progressione della steatosi in fibrosi (159). In pazienti obesi e diabetici tipo 2 i livelli di leptinemia sono risultati ridotti se confrontati con quelli di pazienti solo obesi con simile grado di insulino-resistenza; tale risultato sembra quindi essere correlato non all'obesità o insulino-resistenza ma alla ridotta e alterata pulsatilità fisiologica della secrezione insulinica (160). Uno studio coreano ha evidenziato che il grado di steatosi (determinato ecograficamente) correla con i livelli di leptina, non vi è invece relazione con adiponectina e resistina (161). Diversi invece i risultati di un recente studio spagnolo che ha correlato i gradi di steatosi (determinati istologicamente) con le adipochine e l'insulino-resistenza; l'adiponectina e la resistina correlano con la steatosi, non si rileva invece aumento di leptina e TNF α all'aumentare dell'entità della steatosi (162). E' stato evidenziato dal confronto di pazienti grandi obesi con e senza insulino-resistenza che in quelli con insulino-resistenza vi era una riduzione di adiponectina e un aumento della resistina, non vi erano invece differenze per la leptina (163).

La *resistina* è una proteina derivata dal tessuto adiposo che potrebbe avere un ruolo importante nell'insulino-resistenza, il dato è confermato nei modelli murini ma non è ancora ben definito nell'uomo (159).L'aumento dell'espressione di questa proteina in un modello murino porta ad intolleranza al glucosio, iperinsulinemia e soppressione dei livelli degli acidi grassi liberi (164).Nuove evidenze indicano inoltre che la resistina possa stimolare il processo infiammatorio (165). I livelli circolanti di resistina e l'espressione dell'm-RNA nel tessuto adiposo sono più elevati nei pazienti con NAFLD, il livello di resistina sierica è inoltre correlato con la severità dell'istologia, infatti

la resistina induce un aumento dell'IL-6 e del TNF- α , l'obesità e l'insulino-resistenza periferica non sono associati però all'aumento della resistina (166).

Un altro mediatore dell'insulino-resistenza è il *tumornecrosisfactor α* (TNF- α), in grado di inattivare la tirosina chinasi del recettore insulinico, con conseguente stimolazione della lipogenesi e promozione della steatosi epatica. Il TNF- α prende parte nella regolazione di cellule, enzimi mitocondriali e citochine coinvolti nel processo infiammatorio, contribuendo potenzialmente all'insorgenza di fibrosi, ed è inoltre coinvolto nel processo di apoptosi degli epatociti. Il TNF- α promuove il danno epatico ed è stata riportata una correlazione tra il valore di TNF- α plasmatico e la severità della NASH (143).

3.4 NAFLD: clinica

Dal punto di vista clinico molti pazienti affetti da NAFLD non riferiscono segni/sintomi di epatopatia; i sintomi più comunemente riferiti sono invece astenia, malessere, sensazione di peso a livello dell'ipocondrio destro, dispepsia e nausea. L'epatomegalia è l'unico reperto obiettivo (variabile tra il 25% e il 75% dei pazienti) tra l'altro non sempre apprezzabile a causa dell'obesità addominale. Le stigmati cliniche di epatopatia cronica oppure di cirrosi (come la ginecomastia, il caput medusae, l'atrofia muscolare, l'ittero) sono abbastanza infrequenti. Un'alta percentuale di soggetti con cirrosi criptogenica presenta molte delle caratteristiche epidemiologiche e demografiche di pazienti con NAFLD suggerendo che questa condizione possa essere una NAFLD misconosciuta (167).

3.5 NAFLD:diagnosi

Parametri Biomorali

Attualmente, non esistono marcatori biochimici sensibili e specifici per la NAFLD. Un aumento (o diminuzione) dell'alanina aminotransferasi (ALT) è spesso utilizzato come marcatore biochimico per monitorare la progressione (o miglioramento) di NAFLD, nonostante il fatto che le concentrazioni di ALT possono essere fuorvianti e non rifletterne la gravità o l'esito. I reperti di più frequente riscontro sono un aumento di ALT, AST oppure di entrambe. Il rapporto AST/ALT è spesso < 1 (168), anche se questo rapporto tende ad aumentare con l'avanzare della fibrosi portando ad una perdita di accuratezza in pazienti con cirrosi. Generalmente le transaminasi non superano di 2-3 volte il limite superiore di normalità e la maggior parte dei pazienti ha valori normali. Non vi è correlazione tra valore delle transaminasi e classificazione istologica (169). La γ GT, la fosfatasi alcalina e l'albumina sono generalmente normali. Dal 10 al 15% dei pazienti presenta un aumento della bilirubina totale; l'ipergammaglobulinemia è stata notata invece nel 30% circa di questi pazienti e la presenza di anticorpi antinucleo è stata dimostrata dal 12% al 40% dei pazienti con NAFLD. La ferritina sierica tende ad essere aumentata in circa la metà dei pazienti e l'aumento della saturazione della transferrina è presente tra il 6 e l'11%.

Diagnostica per Immagini

La diagnosi di NAFLD può essere stabilita dall'*ecografia* e confermata dalla biopsia epatica. Da un punto di vista ecografico il fegato steatosico si

contraddistingue per un'accentuata "brillantezza" (brightliver), che è dovuta ad aumento dell'ecogenicità (evidente dal confronto tra il parenchima epatico e la corticale renale), per l'attenuazione del fascio ultrasonoro, per la perdita di risoluzione dei dettagli strutturali intraepatici, per la perdita di definizione del diaframma e l'impossibilità di distinguere la vena porta. La presenza di vacuoli intracitoplasmatici di grasso determina un incremento delle interfacce e spiega da un punto di vista fisico l'aumento dell'ecogenicità parenchimale. Talvolta la steatosi non interessa in maniera diffusa il parenchima epatico ma può localizzarsi solo in alcuni settori del fegato realizzando il quadro della cosiddetta "steatosi focale" che spesso entra nella diagnosi differenziale con le alterazioni "focali" del fegato. La sensibilità dell'ecografia aumenta con l'aumentare del grado di steatosi. Si è calcolato che la quota di grasso necessaria per avere una buona sensibilità debba essere almeno del 33% (100% di sensibilità, con un valore predittivo positivo del 62%) (170).

La *TC senza mezzo di contrasto* appare essere la più accurata delle tecniche per identificare e caratterizzare la steatosi epatica. La sensibilità della TC risulta ottima per un grado di steatosi maggiore del 33% (sensibilità 93%, valore predittivo positivo 76%) (170), anche se non vi sono molti studi al riguardo per i limiti legati alla elevata esposizione a radiazioni intrinseca alla metodica stessa. L'ecografia pertanto rimane per parecchi autori l'indagine più disponibile, economica e sicura (171).

Al momento attuale non vi sono metodiche di imaging in grado di differenziare la steatoepatite dalla semplice steatosi. L'unica metodica in grado di evidenziare la NASH è la *biopsia epatica*, che però rimane un'indagine non priva di qualche

rischio (172). Dal punto di vista anatomico-patologico le caratteristiche della NAFLD includono: steatosi, fibrosi, infiltrato infiammatorio misto, rigonfiamento e necrosi epatocitaria, corpi di Mallory, nuclei vacuolati e stipati di glicogeno, siderosi. Queste alterazioni possono essere variamente rappresentate e associate; Kleiner ha proposto una stadiazione che valuta il grado secondo un "NAFLD Activity Score" (NAS) assegnando un punteggio separato per entità steatosi, ballooningepatocitario e infiammazione lobulare, e lo stadio in base all'entità della fibrosi (173).

La diagnosi di epatopatia steatosica non alcolica è spesso sospettata in persone con aumento degli enzimi epatici, reperti ecografici di steatosi epatica oppure epatomegalia non spiegata da altra causa. Il gold standard per la diagnosi di NAFLD è la correlazione clinico-patologica con la conferma di steatosi attraverso la biopsia epatica e l'esclusione clinica di altre cause (in particolare il consumo di alcol ed altri agenti epatotossici) (174). Un'accurata anamnesi (mirata ad escludere l'abuso di alcol e farmaci) ed un esame obiettivo dettagliato sono essenziali. Devono essere escluse inoltre altre cause di epatopatia come forme virali, autoimmuni, fattori metabolici oppure ereditari, farmaci o tossine. Da ciò deriva che spesso la NAFLD è una diagnosi di esclusione. La biopsia epatica gioca un ruolo fondamentale per confermare o meno la diagnosi di NAFLD in quanto è la tecnica più sensibile e specifica ed in grado di fornire informazioni di tipo prognostico. La biopsia è anche utile per verificare l'effetto del trattamento medico in quanto la correlazione tra danno istologico e tecniche di imaging è scarsa. Tale procedura è però spesso non praticata in quanto la biopsia rappresenta solo una piccola porzione di fegato (circa 1/50000) e ciò può

portare ad errori di campionamento. Inoltre è stata notata una certa variabilità di interpretazione tra anatomo-patologi. Infine, la biopsia è affetta da una morbilità (con complicanze serie intorno all'0,3%) e da una mortalità intorno all'0,01% (135,174).

3.6 NAFLD: Terapia e Storia Naturale

Una terapia eziologica della NAFLD non esiste. Gli interventi terapeutici mirano a migliorare l'insulino-resistenza, che è alla base della sindrome metabolica, tipica di questi soggetti. Primo fra tutti è l'intervento sullo stile di vita che comporta una diminuzione dell'introito calorico associato ad un aumento dell'attività fisica finalizzati ad ottenere un calo ponderale. Un calo ponderale del 5-10% è in grado di indurre una riduzione delle transaminasi e del volume epatico, un calo ponderale troppo veloce (maggiore di 1,6 kg/settimana) invece peggiora il quadro epatico in quanto promuove una mobilitazione massiva dei grassi dal tessuto adiposo (per attivazione della lipolisi) che arrivano direttamente al fegato attraverso la vena porta. L'esercizio fisico (aerobico) aumenta la sensibilità insulinica e migliora l'utilizzo dei substrati a livello muscolare. La perdita di peso e l'esercizio fisico aumentano in modo significativo i livelli di adiponectina, riducono i livelli di leptina ed aumentano l'insulino-sensibilità in soggetti obesi (175). Se sono presenti iperglicemia e/o dislipidemia (caratteristici della sindrome metabolica) si devono trattare questi fattori con la somministrazione di farmaci insulino-sensibilizzanti come la metformina ed i tiazolidinedioni (TZD) e con la somministrazione di statine laddove necessario. La metformina diminuisce la neoglucogenesi, diminuisce l'assorbimento di zuccheri a livello gastro-intestinale e aumenta l'insulino-

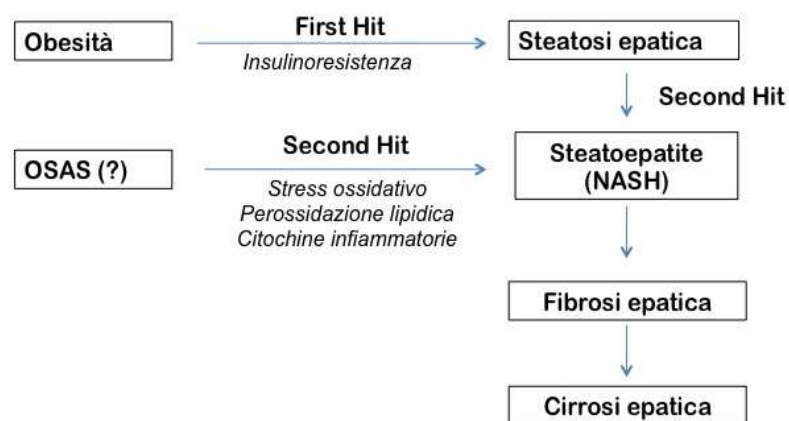
sensibilità, riduce la β -ossidazione mitocondriale e riduce la steatosi grazie all'azione inibitoria sul TNF- α . È stato visto che nei topi questo farmaco ha anche un ruolo nel ridurre la lipogenesi epatica, le transaminasi epatiche e la progressione della NAFLD, mentre aumenta l'ossidazione di acidi grassi sempre a livello epatico (176). La metformina rispetto a terapia dietetica riduce le transaminasi, normalizzandole nel 55% dei casi (177). I TZD si legano al recettore PPAR γ ed aumentano l'insulino-sensibilità facilitando il deposito di trigliceridi negli adipociti ed impedendo il deposito di trigliceridi nel fegato e nel muscolo. I TZD indirettamente inducono un miglioramento della sensibilità insulinica attraverso l'aumento della adiponectina e hanno anche attività anti-infiammatoria. Uno studio di Belfort ha rilevato che l'utilizzo di pioglitazone migliorando l'insulino-resistenza induce riduzione delle transaminasi, della steatosi e della necroinfiammazione; l'effetto a lungo termine rimane però incerto (178). L'assunzione degli insulino-sensibilizzanti (metformina e TZD) induce una riduzione/normalizzazione delle transaminasi, ma tale effetto è reversibile alla sospensione del farmaco.

La NAFLD è stata considerata a lungo una condizione benigna, rappresenta però un fattore di rischio per patologie epatiche più gravi che portano alla fibrosi e alla steatoepatite non alcolica (NASH). Circa il 10% dei pazienti con NAFLD evolve in NASH che a sua volta può progredire in cirrosi, morte per cause epatiche ed epatocarcinoma rispettivamente nel 25%, 10% e 1% dei casi (122,179). La NAFLD sembra comunque essere a lenta progressione, con una minoranza di pazienti affetti che presenterà morbilità e morbidità patologia-correlata (180).

4. OSAS e NAFLD: associazione o nesso causale?

Nei pazienti OSAS, l'insulino-resistenza correlata all'obesità e possibilmente all'ipossia intermittente, provoca accumulo di trigliceridi nel fegato (steatosi epatica, first hit). Il "second hit" dello stress ossidativo potrebbe essere indotto dall'ipossia intermittente, determinando la progressione verso la steatoepatite e la fibrosi epatica. L'esistenza di steatosi è però necessaria per innescare il processo infiammatorio.

Figura 11. Patogenesi della NAFLD: teoria dei 2hits e possibile ruolo dell'OSAS(240)



Day et al. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998

Esperimenti su animali dimostrano che l'ipossia intermittente provoca lesioni epatiche di minore entità in assenza di steatosi epatica, mentre può chiaramente contribuire al processo di progressione verso la steatoepatite agendo di concerto con altre cause, quali l'obesità da dieta ipercalorica o la tossicità da acetaminofene (181,182).

L'ipossia cronica intermittente, caratteristica dell'OSAS, può indurre la produzione di citochine infiammatorie e stress ossidativo (183) contribuendo non solo all'aumento dell'insulino-resistenza, ma accelerando anche il processo di fibrosi del fegato che porta alla progressione della steatosi a steatoepatite. Nonostante diversi studi abbiano affrontato questo tema, i risultati sono ancora controversi. La sfida è dimostrare che esiste un'associazione indipendente (184) tra queste due condizioni, e non una semplice coincidenza dovuta al fatto di avere l'obesità come denominatore comune, un fattore di rischio già stabilito per l'insulino-resistenza, OSAS e NAFLD (185).

Alcuni autori hanno dimostrato questa associazione nei soggetti obesi e in sovrappeso attraverso tecniche di imaging e i livelli degli enzimi epatici. *Chin et al.* (186) hanno studiato gli effetti dell'OSAS sui livelli sierici delle transaminasi in pazienti obesi, e le variazioni ottenute dopo terapia con CPAP. In 44 pazienti obesi con OSAS, il 35% aveva anormali livelli di transaminasi, specialmente al mattino rispetto al pomeriggio precedente. Dopo 1 e 6 mesi di trattamento con CPAP nasale i valori delle transaminasi risultavano ridotti (AST : da 6 ± 11 UI/l a 2 ± 6 IU/l ; ALT : da 5 ± 9 UI/l a 2 ± 6 UI/l. Anche i livelli di leptina erano diminuiti in modo significativo, mentre l'insulino-resistenza e i trigliceridi rimanevano invariati.

Tatsumi&Saibara (187) hanno studiato 83 pazienti non obesi ($BMI \leq 30$ kg/m²) con e senza diagnosi di OSAS con TC per la diagnosi di NAFLD e i livelli sierici di pro collagene di tipo III (P-III-P) per rilevare steatoepatite. Gli autori concludevano che le desaturazioni dell'OSAS rappresentano un fattore

di rischio per la steatoepatite e la gravità di OSA potrebbe contribuire alla patogenesi della fibrosi epatica. Tuttavia, la limitazione di questi studi riguarda la mancanza di dati istologici, che non consente una valutazione in concreto della presenza e della gravità della NAFLD.

Nello studio di *Tannè et al.* (188), sono stati valutati 163 pazienti con sospetta OSAS; i pazienti con OSAS grave ($AHI \geq 50/h$) presentavano maggiore insulino-resistenza, avevano una più alta percentuale di steatosi, necrosi epatica e fibrosi alla biopsia, pur avendo lo stesso BMI. In questo studio, gli enzimi epatici sono stati misurati in tutti i pazienti, ma i dati istologici sono stati ottenuti esclusivamente nel 50% ($n=16$) dei pazienti con elevati livelli degli enzimi.

Nello studio di *Singh et al.* (189), sono stati studiati 190 pazienti con una diagnosi biochimica di NAFLD (116 con steatosi e 74 con steatoepatite), di cui 50 erano stati sottoposti a biopsia epatica e a screening per OSA mediante questionario di Berlino. Su 190 pazienti con NAFLD, 87 soddisfacevano i criteri di OSA dopo il questionario, suggerendo l'opportunità che i pazienti con NAFLD siano sottoposti a screening per OSA tramite polisonnografia o poligrafia respiratoria. Tuttavia, questo studio presenta la limitazione che l'OSAS è stata valutata mediante un questionario del sonno, e la biopsia epatica non è stata eseguita su tutti i pazienti.

Nello studio trasversale di *Lin et al.* (190) eseguito su un gruppo di pazienti di entrambi i sessi con diagnosi ecografica di NAFLD si è trovato che i pazienti con OSAS erano più frequentemente colpiti da NAFLD (83,5%) e che l'possia

notturna era associata con l'aumento degli enzimi epatici, indipendente da una varietà di fattori quali l'età, il sesso, l'obesità, l'infiammazione, la pressione sanguigna, glicemia, e il profilo lipidico, suggerendo che l'ipossia notturna potrebbe essere un fattore di rischio di progressione della NAFLD. Inoltre i loro risultati hanno mostrato che il danno epatico è meglio predetto dai marcatori di desaturazione ossiemoglobinica che dall'AHI, come dimostrato da altri studi (191,192,193). *Linnet al.*(190) suggeriscono inoltre che i ripetuti episodi di ipossiemia notturna che si verificano nel sonno nei pazienti OSAS possono agire da “second hit” nella progressione della NAFLD.

Lo studio di *Minville et al.* (194) di recente pubblicazione ha preso in esame una vasta popolazione OSAS non selezionata con vario BMI (dal magro al severamente obeso) dimostrando che la gravità dell'ipossia notturna è associata in modo indipendente con la gravità della steatosi, che l'obesità preesistente aggrava gli effetti dell'ipossia notturna e che la NAFLD è uno dei meccanismi coinvolti nella disfunzione endoteliale dei pazienti OSAS.

Per valutare l'associazione tra l'OSAS con le alterazioni degli enzimi epatici, *Kohler et al.* (195) hanno eseguito uno studio clinico randomizzato; 94 pazienti con OSAS da moderata a grave sono stati assegnati a terapia con CPAP terapeutica o subterapeutica per 4 settimane. I livelli sierici di AST e ALT sono stati confrontati, prima e dopo l'uso di CPAP all'interno dei due gruppi. I livelli di ALT si riducevano da 39 ± 26 a 30 ± 16 UI/l nei pazienti trattati con CPAP terapeutica, ma anche nei pazienti trattati con CPAP subterapeutica si otteneva una riduzione da 37 ± 21 a 32 ± 17 UI/l, mentre i livelli di AST rimanevano invariati. Pertanto, l'ALT sembra più sensibile dell'AST,

ma il trattamento con CPAP non sembra migliorare la funzione epatica dei pazienti con OSAS. Quest'ultimo punto contrasta con i risultati dello studio di *Kheirandish-Gozal et al.* (196) in 518 bambini con sospetto di OSAS o di russamento, che confermava la relazione tra OSA e transaminasi sieriche solo nei bambini obesi; la risoluzione dell'OSAS era associata a riduzione degli enzimi epatici nei bambini obesi.

Diversi studi hanno valutato l'associazione tra OSAS e NAFLD prendendo in esame i dati della biopsia epatica. *Daltro et al.* (197) hanno studiato 40 pazienti obesi sottoposti a chirurgia bariatrica; l'OSA è stata diagnosticata in 32, la NAFLD in 33 e la NASH in 32 pazienti. I soggetti con $AHI \geq 15$ avevano livelli di insulinemia e di HOMA-IR più alti rispetto a coloro che avevano un $AHI \leq 15$, ma non si riscontrava alcuna associazione tra AHI e diagnosi di NASH (81% vs 79%); inoltre la gravità dell'ipossiemia notturna non correlava con il riscontro di NASH.

Nel lavoro di *Jouet et al.* (198) in pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica ($BMI \geq 40$ kg/m² negli uomini e $BMI \geq 35$ kg/m² nelle donne), la presenza di OSAS si associava a livelli di enzimi epatici più elevati rispetto a quelli registrati in pazienti senza OSAS. Inoltre valori anormali degli enzimi epatici tendevano ad aumentare con la gravità di OSAS, essendo presenti nel 25% dei pazienti non OSAS e nel 43% e 53% rispettivamente dei pazienti con OSAS moderata e grave. Tuttavia lo studio di Jouet et al. non dimostrava alcuna correlazione tra OSAS e presenza di NASH o altre lesioni epatiche. Gli autori peraltro non hanno indagato l'associazione tra AHI e desaturazione ossiemoglobina con l'insulino-resistenza.

In uno studio retrospettivo su pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica, *Kallwits et al.* (199) non è stata documentata alcuna tendenza ad una maggiore prevalenza di OSA ($AHI \geq 15$ ev / h) in pazienti con progressiva malattia epatica, indicata da infiammazione e fibrosi (73,3%), rispetto ai pazienti quelli che presentavano solo steatosi epatica (45,8%) ($p = 0,06$).

Lo studio pubblicato dal *Mishra&Younossi* (200) presenta una maggiore casistica e porta risultati discordanti rispetto agli studi precedenti. Pazienti affetti da NASH avevano AHI maggiore e più bassi livelli di SaO_2 minima durante il sonno rispetto a coloro che avevano solo steatosi epatica. Gli autori suggeriscono che l'ipossiemia notturna associata all'OSAS può essere un fattore di rischio per la NASH. In questo studio, l'HOMA- IR è stata valutata solo in un sottogruppo dei pazienti, non fornendo così la possibilità di valutare il rapporto tra insulino-resistenza e OSA nei pazienti con NAFLD.

Più recentemente, lo studio di *Sundaram et al.*(191) basato su pazienti pediatriche con biopsia epatica positiva per NAFLD mostrava che la gravità e la durata dell'ipossiemia sono associati con elevati livelli di AST e ALT e correlano con la gravità della NAFLD.

Brunt et al. (201) hanno suggerito che l'infiammazione portale cronica può essere un marker di progressione di NAFLD. In questo studio, non è stata trovata correlazione tra AHI o desaturazione ossiemoglobinica con il grado di fibrosi o correlazione tra infiammazione e fibrosi portale con i parametri polisonnografici.

I limiti di questi ultimi studi possono essere discussi insieme per le similarità metodologiche. I risultati sono stati ottenuti solo in pazienti obesi, che possono non rappresentare l'intera popolazione di pazienti con NAFLD, e l'obesità di per sé è una causa di fibrosi epatica, che porta ad una forte variabile di confondimento. Tutti gli studi erano osservazionali, mancando di carattere prospettico per valutare meglio questa associazione e, infine, lo stress ossidativo, derivante dalla ipossia intermittente, come meccanismo d'azione della progressione della NAFLD non è stato indagato (185).

Gli studi su pazienti OSAS non possono, per ovvi motivi etici, fornire campioni bioptici epatici per lo studio della funzione epatica nell'OSAS. Diversi studi hanno esaminato la correlazione tra ipossia intermittente e lesioni epatiche in modelli animali, concludendo che l'OSAS può portare all'aumento degli enzimi epatici. Tra questi ricordiamo lo studio di Savransky et al. (181) in cui si valutavano gli effetti dell'ipossia intermittente sul fegato di topi normopeso. I topi C57BL/6J esposti a ipossia intermittente per 12 settimane (CIH, chronicintermittenthypoxia) mostravano aumento di ALT (224 ± 39 U/l vs 118 ± 22 U/l nel gruppo trattato con aria intermittente), mentre AST e fosfatasi alcalina erano invariati nei due gruppi. La CIH induceva anche iperglicemia, diminuzione dei livelli sierici di insulina a digiuno, e lieve aumento nel siero di colesterolo e trigliceridi a digiuno, mentre a livello epatico il contenuto dei trigliceridi rimaneva invariato e il colesterolo diminuito. All'esame istologico si riscontrava un rigonfiamento degli epatociti senza evidenza di steatosi epatica. Tuttavia, CIH aumentava di quasi due volte la perossidazione lipidica nel tessuto epatico, e potenziava l'effetto tossico

dell'acetaminofene. In sintesi, la CIH in assenza di obesità causava danno epatico, stress ossidativo e un eccessivo accumulo di glicogeno nel fegato, senza alcuna evidenza di steatosi semplice o di NASH.

Feng et al. (202) hanno studiato l'influenza della CIH sugli enzimi epatici di ratto, sull'istologia e l'ultrastruttura epatica sulla base dei disturbi lipidici. Ratti Wistar sono stati randomizzati e divisi in tre gruppi; il gruppo di controllo è stato alimentato con una dieta regolare, il secondo gruppo di topi grassi con una dieta ricca di grassi ed il terzo gruppo di topi molto grassi con una dieta a più alto contenuto di grassi associata ad un trattamento di ipossia intermittente per 7 h/die. Variazioni degli enzimi epatici e alterazioni istologiche e ultrastrutturali a carico del fegato sono state osservate nei tre gruppi per 9 settimane, e l'incremento degli enzimi epatici era significativamente più elevato nei topi del terzo gruppo rispetto agli altri. Le alterazioni istologiche e ultrastrutturali epatiche andavano dalla semplice steatosi alla steatoepatite e fibrosi epatica, la gravità del quadro epatico aumentava col tempo di esposizione ed era massima nei topi molto grassi, alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi, e sottoposti a CIH. I livelli di ALT e AST aumentavano già dopo tre settimane nei topi trattati con dieta ipercalorica e con CIH, ma dopo nove settimane i livelli erano fino a quattro volte superiori rispetto ai topi del gruppo di controllo e due volte superiori rispetto ai topi del secondo gruppo. Esperimenti su animali hanno dimostrato che l'ipossia intermittente è associata ad un aumento dei trigliceridi epatici sia in topi obesi (203) che in topi magri (204).

Ad oggi la maggior parte degli studi sulla relazione che intercorre tra OSAHS e NAFLD concordano su un'unica teoria fisiopatologica, la teoria “two-hit” (182, 187, 190, 199, 200, 205). Data la crescente prevalenza dell'obesità nel mondo, e considerando l'alta frequenza con cui queste condizioni influenzano l'obesità, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire i dubbi che ancora esistono. Altri studi sono necessari per stabilire se vi è un'associazione indipendente tra OSAS e NAFLD o se è solo una coincidenza.

In sintesi, allo stato attuale si può concludere che:

1) Gli studi eseguiti sia sugli animali che sugli umani mostrano che l'OSAS può contribuire alla patogenesi di lesioni croniche al fegato, principalmente rappresentate dalla NAFLD;

2) Ad oggi la maggior parte degli studi incentrati sulla relazione che intercorre tra OSAHS e NAFLD concordano su un'unica teoria fisiopatologica, la teoria “two-hit” (182, 187, 190, 199, 200, 205).

3) Data la crescente prevalenza dell'obesità nel mondo, e considerando l'alta frequenza con cui queste condizioni influenzano l'obesità, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire i dubbi che ancora esistono. Altri studi sono necessari per stabilire se vi è una indipendente associazione tra OSAS e NAFLD o se è solo una coincidenza.

5.CONTRIBUTO SPERIMENTALE

5.1 Scopo della tesi

Obiettivo di questo progetto di ricerca è stato di analizzare markers di funzionalità epatica in pazienti OSAS, in rapporto alla gravità dei disturbi notturni e dell'obesità. Tale scopo è stato sviluppato in 4 protocolli sperimentali:

1. Studio della funzione epatica mediante determinazione delle transaminasi sieriche in 102 pazienti consecutivi afferenti al Nostro laboratorio del Sonno con OSAS alla diagnosi e senza evidenza anamnestica di malattia epatica;

2. Studio longitudinale “pilota” sulla funzione epatica e di imaging (ecografia addominale, Fibroscan) in pazienti consecutivi con diagnosi di OSAS e documentata assenza di patologia epatica alcolica o infettiva, e valutazione degli effetti della terapia dell'OSAS con CPAP sulle stesse variabili;

3. Analisi dei dati di funzionalità epatica di una popolazione di circa 500 pazienti studiati per sospetta OSAS presso il laboratorio del sonno dell'Ospedale Son Dureta, Palma di Majorca (MallorcaCohort) allo scopo di valutare la prevalenza delle anomalie degli enzimi di funzionalità epatica in una vasta popolazione di pazienti OSAS alla diagnosi e analizzare i rispettivi effetti dell'OSA e dell'obesità viscerale sugli enzimi epatici.

4. Studio osservazionale eseguito su una coorte di 126 pazienti con NAFLD a bassa prevalenza di obesità patologica, su cui è stata eseguita ecografia carotidea e questionario STOP-BANG seguito da poligrafia

cardiorespiratoria (PG) in un sottogruppo di 50 pazienti, per valutare la prevalenza dell'OSAS nei pazienti con NAFLD e l'associazione tra gli indici di saturazione ossiemoglobinica (SaO₂) e la gravità della fibrosi epatica e il rischio di aterosclerosi carotidea.

5.2 Materiali e Metodi

Protocollo 1

Nel primo protocollo sono stati reclutati 107 pazienti consecutivi (24 donne), con storia clinica e recente diagnosi di OSAS ottenuta mediante monitoraggio respiratorio notturno.

I criteri d'inclusione usati nella selezione del campione erano: assenza di storia o di evidenza clinica di malattie epatiche o autoimmuni, consumo di alcool non superiore a 30 g/die, e volontà di partecipare allo studio. Tutti i pazienti hanno firmato un modulo di consenso informato, ed è stata ottenuta l'approvazione da parte del Comitato Etico dell'Azienda Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello.

In tutti i pazienti, sono stati prelevati campioni di sangue venoso al mattino a digiuno per misurare:

- ✓ Enzimi epatici nel siero: aspartato-aminotransferasi (AST), alanina-aminotransferasi (ALT), gamma-glutamilttransferasi(γ -GT), e fosfatasi alcalina;
- ✓ Glicemia e assetto lipidico (colesterolo totale e frazioni HDL, LDL e VLDL, trigliceridi);

- ✓ L'insulinemia sierica, determinata in 64 pazienti, e l'HOMA Index per valutare l'insulino-resistenza secondo la formula: $\text{Insulina (mU/L)} \times \text{glicemia a digiuno (mg\%)} \times 0.0024663$ (valore normale <2.4).

Protocollo 2

Nel secondo protocollo, sono stati arruolati 20 pazienti (4 donne) secondo criteri simili a quelli del protocollo 1. In tutti i pazienti sono state escluse patologie infettive epatiche (HBV, HCV) pre-esistenti, eccessivo consumo di alcool (>30 g/die). Inoltre, l'uso di statine era un criterio di esclusione. I pazienti sono stati sottoposti alle stesse indagini ematochimiche del protocollo precedente. La steatosi epatica è stata valutata in modo qualitativo mediante ecografia epatica (assente, lieve, moderata, grave). Per la misurazione della fibrosi epatica, ci si è avvalsi della tecnica del Fibroscan (265-266), di recente introduzione nella pratica clinica. Il metodo misura l'elasticità del parenchima epatico in differenti sedi, e stima pertanto indirettamente la presenza di fibrosi epatica. Sullo stesso campione in esame è stato valutato l'effetto della terapia dell'OSAS con CPAP, effettuata dai pazienti per almeno 4 h/notte, sulle stesse variabili. I pazienti sono stati rivalutati a 6 mesi e/o un anno dalla diagnosi con lo stesso protocollo usato all'inizio dello studio (valutazione clinica, studio del sonno, i campioni di sangue per la determinazione dei metabolici e infiammatori marcatori, valutazione non invasiva della steatosi epatica e fibrosi). Due pazienti hanno lasciato lo studio dopo la valutazione di 6 mesi.

Protocollo 3

Sono stati analizzati i dati di 520 pazienti OSAS di razza Caucasica, studiati consecutivamente negli anni 2005-2007 nel laboratorio del Sonno dell'Ospedale Son Dureta, Palma di Maiorca, Spagna, già analizzati per l'analisi trasversale della Sindrome Metabolica nell'OSAS (249) nell'ambito di una collaborazione scientifica tra l'Università di Palermo e i Centri del Sonno dell'Università di Lleida e Palma de Mallorca, Spagna. I criteri di inclusione erano: età superiore a 18 anni, recente diagnosi di OSAS, e disponibilità a partecipare allo studio.

Tutti i pazienti sono stati studiati mediante polisonnografia completa, e la diagnosi di OSAS è stata posta sulla base di $AHI \geq 10$ eventi per ora. La sonnolenza diurna è stata soggettivamente valutata mediante scala della sonnolenza di Epworth (ESS), e considerata presente se lo score era ≥ 10 . In ogni soggetto è stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI, kg/m^2), ed è stata misurata la circonferenza del collo. La valutazione della Sindrome Metabolica è stata effettuata secondo i criteri del NCEP-ATP III (117). In ogni soggetto è stata misurata la circonferenza della vita in cm, e la pressione arteriosa mediante sfigmomanometro standard dopo 5 minuti a riposo, secondo le raccomandazioni delle linee-guida. Sono stati effettuati prelievi di sangue venoso a digiuno per la determinazione della glicemia, dei lipidi sierici, dei markers di funzionalità epatica e renale, della PCR ad alta sensibilità mediante metodi di laboratorio standard (Hitachi Modular Analyzer, Roche). Inoltre, in 288 pazienti non diabetici è stata misurata l'insulinemia mediante

chemiluminescenza (Immulite 2000 Analyzer), e l'insulino-resistenza è stata stimata calcolando l'HOMA Index.

Protocollo 4

Lo studio ha coinvolto 126 pazienti consecutivi con NAFLD, reclutati presso l'Unità di Gastroenterologia ed Epatologia del Policlinico Universitario di Palermo, che rispondevano a tutti i criteri di inclusione ed esclusione di seguito indicati. Criteri di inclusione erano: diagnosi istologica di NAFLD su una biopsia epatica fatta meno di 6 mesi prima dell'arruolamento e che mostrava steatosi (> 5% di epatociti) con o senza necroinfiammazione e/o fibrosi compresa la cirrosi. La valutazione pre-biopsia di NAFLD era basata su riscontro cronico di elevati valori di ALT per almeno 6 mesi e consumo di alcol <20 g/giorno nell'anno precedente (anche confermata da questionario). I criteri di esclusione erano: (1) cirrosi scompensata (ittero, presenza di ascite o encefalopatia); (2) il carcinoma epatocellulare; (3) malattie epatiche di eziologia diversa o mista (il consumo eccessivo di alcol, l'epatite C, l'epatite B, malattia epatica autoimmune, malattia di Wilson, emocromatosi, deficit di α 1-antitripsina); (4) l'infezione da virus dell'immunodeficienza umana; (5) precedente trattamento con terapia antivirale, farmaci immunosoppressori e/o l'uso regolare di farmaci che inducono steatosi (steroidi, amiodarone, tamoxifene, etc.), valutata al colloquio; (6) storia di malattie cardiache (malattia coronarica sia o cardiaco); (7) dipendenza attiva droghe per via endovenosa; (8) indice di massa corporea (BMI) >45; (9) precedente valutazione per OSAS, o precedente diagnosi di OSAS. Un campione di sangue dopo digiuno di 12 ore è stato prelevato al momento della biopsia per

determinare i livelli sierici di ALT, colesterolo totale, colesterolo LDL, colesterolo HDL, trigliceridi, glicemia, insulina, e la conta piastrinica. I pazienti che hanno accettato sono stati poi sottoposti ad ecografia carotidea e monitoraggio cardiorespiratorio notturno al domicilio.

Statistica.I dati sono riportati come medie \pm SD in caso di variabili continue, e come prevalenza (%) in caso di variabile categoriche. I dati dei pazienti con e senza aumento di ALT sono stati paragonati mediante t-test per dati non appaiati nel caso di variabili continue, e mediante Chi-quadro nel caso di variabili categoriche. L'insulinemia e l'HOMA index sono stati analizzati dopo trasformazione logaritmica, a causa della distribuzione non-normale dei dati originali. La regressione lineare semplice e multipla è stata utilizzata per analizzare la correlazione tra variabili. La regressione logistica è stata usata per analizzare i dati del protocollo 4. La significatività statistica era $p < 0.05$ in tutti i test. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Statview per Windows.

5.3 Risultati

Protocollo I: Analisi delle transaminasi sieriche in pazienti OSAS consecutivi

La prima colonna della Tabella 5 illustra le caratteristiche del campione analizzato. Il campione è tipico della popolazione dei pazienti OSAS, di media età, obeso, con OSAS da moderata a severa sulla base dei valori di AHI e della saturazione ossiemoglobinica (SaO₂) minima e media durante le ore notturne. I pazienti studiati riferivano un grado significativo di sonnolenza diurna, come mostrato da uno score medio di sonnolenza di Epworth di 13 punti (valore normale <10). Più del 50% dei pazienti erano in trattamento anti-ipertensivo, un terzo erano diabetici ed un quarto riferivano uso di statine. Un valore di ALT patologico (>40 U/L) è stato riscontrato in 11 pazienti, pari al 10.2% del campione. Un valore di AST patologico (>41 U/L) era invece presente in 5 pazienti, pari al 4.7% del campione. Un aumento di gamma-GT è stato riscontrato in 6 pazienti, pari al 5.6% del campione. Nessun paziente mostrava valori di fosfatasi alcalina oltre i valori normali.

Il confronto tra i pazienti con ALT normale e aumentata è mostrato nella Tabella 5. L'unica differenza significativa tra i due gruppi era che i pazienti OSAS con ALT aumentate erano di circa 10 anni più giovani dei pazienti OSAS con ALT nei limiti di norma.

Tabella 5. Caratteristiche del Campione

	Tutti i pazienti (n=102)	ALT normale (n=91)	ALT >40 U/L (n=11)
Età (anni)	55.8 ± 13.7	57.0 ± 13.6	46.1 ± 9.9*
BMI (kg/m ²)	37.5 ± 8.8	37.1 ± 9.0	40.7 ± 6.4
AHI (eventi/h)	46.4 ± 22.5	45.9 ± 22.3	50.5 ± 25.2
SaO ₂ min (%)	68.8 ± 12.7	69.0 ± 12.7	66.7 ± 12.5
Sonnolenza (ESS)	12.8 ± 5.1	12.7 ± 4.9	13.6 ± 7.1
Farmaci anti-ipertensivi (n=100)	62	55	7
Farmaci per il diabete (n=99)	31	26	5
Statine (n=99)	25	23	2

* p<0.05 vs gruppo con ALT normale

La Tabella 6 mostra le variabili metaboliche nell'intero campione e nei pazienti senza e con ALT aumentata. L'unica differenza significativa tra i due gruppi era che i pazienti con valori patologici di ALT mostravano più alti valori di insulinemia ed un maggior grado di insulino-resistenza analizzato mediante l'HOMA Index. Era inoltre evidente un aumento significativo del colesterolo LDL (p<0.05) nei pazienti con ALT aumentata.

Tabella 6. Variabili Metaboliche

	Tutti i pazienti (n=102)	ALT normale (n=91)	ALT >40 U/L (n=11)
Glicemia a digiuno (mg%)	105 ± 33	104 ± 34	110 ± 21
Insulinemia (μU/ml) (n=58)	16.3 ± 13.3	15.1 ± 13.3	23.5 ± 11.2**
HOMA-IR (n=58)	4.7 ± 6.1	4.3 ± 6.3	7.1 ± 4.7**
Colesterolo totale (mg%) (n=97)	184 ± 44	182 ± 45	193 ± 29
Trigliceridi (mg%) (n=99)	131 ± 64	129 ± 66	153 ± 47
Colesterolo-LDL (mg%) (n=88)	118 ± 44	115 ± 43	144 ± 46§
Colesterolo-VLDL (mg%) (n=88)	26 ± 13	26 ± 13	31 ± 9
Colesterolo-HDL (mg%) (n=88)	39.3 ± 12.0	39.7 ± 12.4	36.1 ± 7.7

** p<0.05, analisi dopo trasformazione logaritmica

§ p=0.06

La Figura 12 illustra l'assenza di correlazione tra i valori di ALT e le variabili indicative di gravità dell'OSAS, quali l'AHI e la SaO₂ minima notturna (pannelli superiori). Per quanto riguarda l'effetto dell'obesità, i valori di ALT correlavano debolmente ma significativamente con il BMI, mentre nessuna correlazione era evidente con la circonferenza del collo (pannelli inferiori).

L' HOMA Index è risultato significativamente correlato al valore di ALT nel siero (p<0.005, Figura 13). Pertanto questi dati suggeriscono che l'obesità e l'insulino-resistenza sono i principali fattori associati all'aumento di ALT, anche se i dati risultano notevolmente dispersi e la regressione con l'HOMA-IR spiega soltanto il 13% della variabilità di ALT. L'OSAS non sembrapertanto associata ad alterazioni della funzionalità epatica indipendentemente dalla coesistente obesità ed insulino-resistenza.

Figura 12. La concentrazione di ALT sierica correla debolmente con il grado di obesità esemplificato dal BMI ma non con le alterazioni tipiche dell'OSAS. I simboli pieni indicano i pazienti con ALT > 40 UI/L.

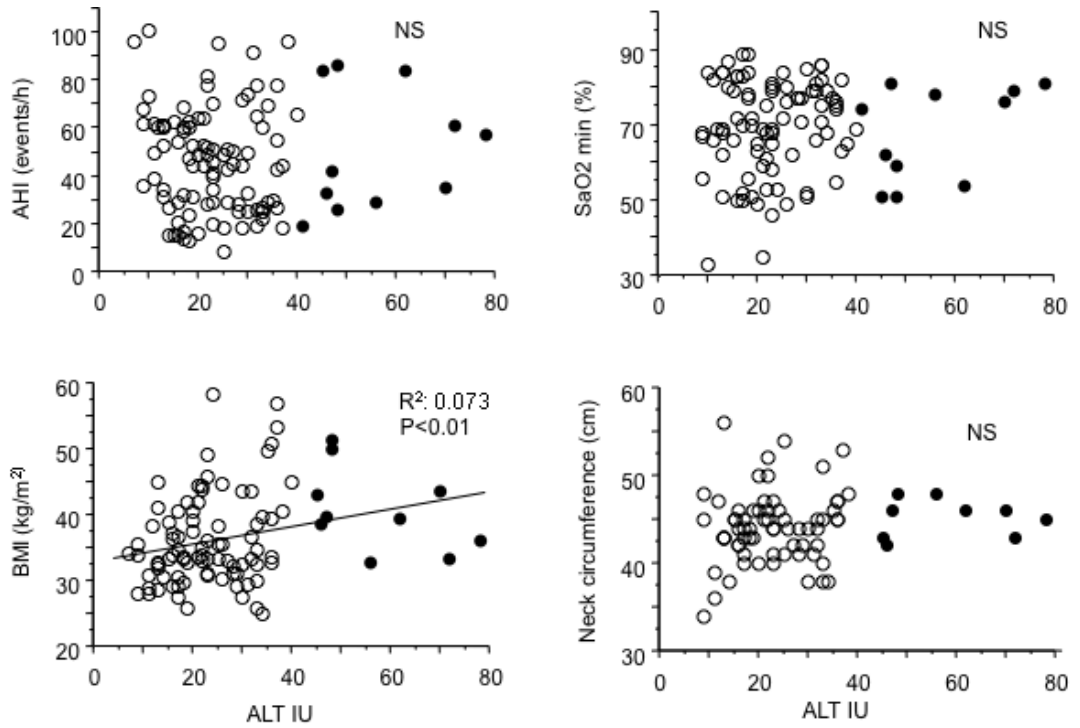
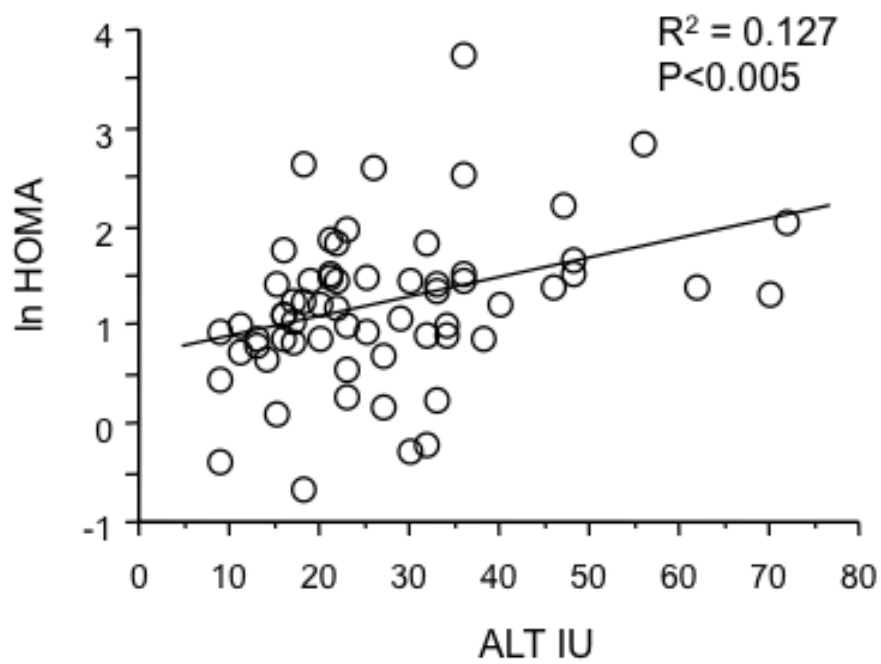


Figura 13. Debole correlazione positiva tra ALT sierica e insulino-resistenza (HOMA Index).



Protocollo II: Misurazione della steatosi e della fibrosi epatica nei pazienti con OSAS e valutazione degli effetti della CPAP sulle stesse

L'analisi trasversale sul campione di pazienti reclutati nel Protocollo II alla diagnosi era composto da individui più giovani (circa 10 anni di differenza in età media), ma era simile a quello del Protocollo I per BMI e gravità dell'OSAS (Tabella 7). Una tendenza all'età più giovane ed un maggiore grado di obesità era evidente nei 3 pazienti con ALT elevata rispetto ai 17 pazienti con ALT normale.

Tabella 7. *Caratteristiche del campione*

§ p=0.05	All patients (n=20)	Normal ALT (n=17)	Increased ALT (n=3)
Age (yr)	48.3 ±11.4	50.3±11.1	36.7±1.5§
BMI (kg/m ²)	34.9±5.9	33.8±5.0	40.9±8.2§
AHI (events/h)	51.7±21.8	52.7±21.3	51.7±21.8
SaO ₂ min (%)	68.4±9.2	70.1±8.7	59.3±7.4
SaO ₂ mean (%)	90.7 ±3.8	91.4±3.3	87.7±5.5
ESS	12.7±4.9	12.2±4.2	15.7±8.5
Anti-HT treatment (n)	11	10	1
Anti-diabetic treatment (n)	2	1	1

Anche in questo gruppo di pazienti, abbiamo osservato un maggior livello di colesterolo LDL nei pazienti con ALT elevata (Tabella 8), mentre la tendenza ad aumento dell'insulinemia e dell'HOMA index non raggiungeva significatività statistica, probabilmente per l'esiguità del campione. Non erano

invece evidenti differenze tra i due gruppi per la glicemia a digiuno o il valore di emoglobina glicosilata.

Tabella 8. *Variabili metaboliche nei pazienti del Protocollo 2*

	All patients (n=20)	Normal ALT (n=17)	Increased ALT (n=3)
Fasting blood glucose (mg/dL)	99±17	98±18	104±16
Serum Insulin (µU/ml)	15.9±8.4	15.4±9.1	18.3±2.4
HOMA IR	3.9±2.0	3.7±2.2	4.7±0.6
Total cholesterol (mg%)	201±35	199±38	207±16
Triglycerides (mg%)	131±77	128±78	144±26
LDL-cholesterol (mg%)	136±42	125±31	184±56*
HDL-cholesterol (mg%)	40.2±8.1	40.5±8.4	38.7±8.0
HbA1c (%)	5.8±1.1	5.8±1.0	6.1±1.4

*: p<0.05

L'analisi della steatosi epatica mediante ecografia addominale (Tabella9) ha evidenziato steatosi di grado lieve in 4 pazienti, e di grado moderato-severo in 14 pazienti. In due pazienti, l'esame non è stato eseguito per problemi tecnici. Tutti e tre i pazienti con ALT elevata mostravano steatosi epatica di grado severo. Nei pazienti con ALT normale, la frequenza di steatosi severa era comunque maggiore che la frequenza di steatosi lieve.

La fibrosi epatica valutata mediante Fibroscan (n=14, tecnicamente impossibile in 3, non eseguita per motivi tecnici in 3) ha fornito in tutti i casi, indipendentemente dalla presenza di ALT elevata, valori nei limiti di norma (media ±SD: 6.2 ±2.3, valore patologico >10).

Tabella 9. Steatosi Epatica alla Diagnosi

	ALT elevata	ALT normale	Totale
Lieve	0	4	4
Moderata	0	1	1
Severa	3	10	13
Non eseguita	0	2	2
totale	3	17	20

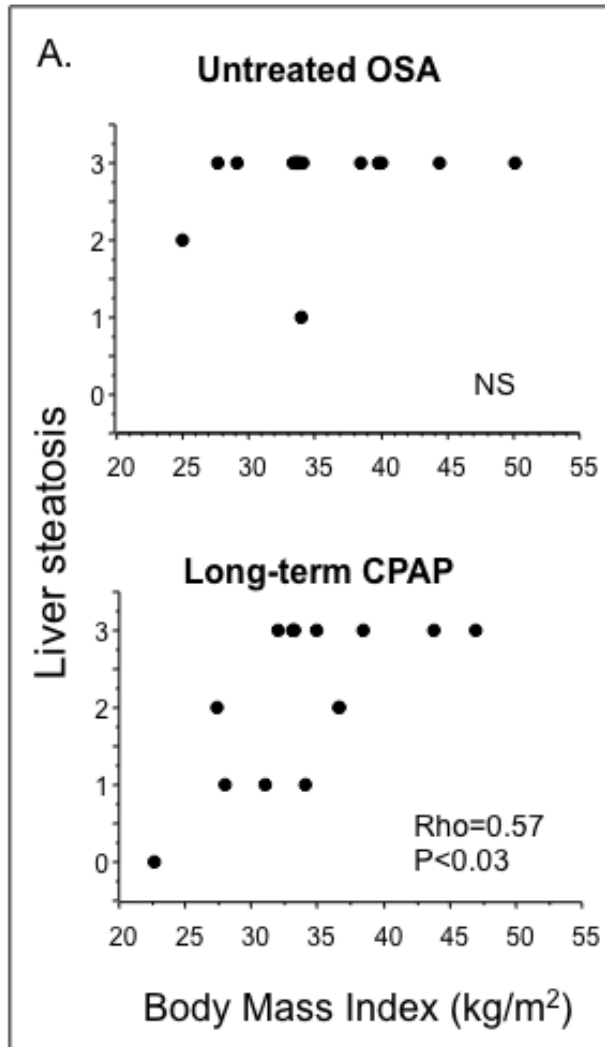
Sullo stesso campione in esame è stato valutato l'effetto della terapia dell'OSAS con CPAP sulla steatosi e fibrosi epatica dopo 6 mesi ed un anno. Tutti i pazienti hanno mostrato una buona compliance al trattamento (>4 h/notte). Di seguito (Tabella 10) sono riportati i dati antropometrici, metabolici e quelli relativi ai disturbi del sonno notturno rilevati a 6 mesi e 1 anno dal trattamento. In particolare gli enzimi epatici ed il BMI (6 mesi: 35.0 ± 6.4 ; 12mesi: 34.4 ± 6.5 kg/m²) non mostravano cambiamenti significativi durante il follow-up.

Tabella 10. *Dati antropometrici, metabolici e quelli relativi ai disturbi del sonno notturno rilevati alla diagnosi, a 6 mesi e 1 anno dal trattamento (n=15)*

	Diagnosi	CPAP 6 mesi	CPAP 12 mesi	p
Età, anni	49.3±11.9			
Peso, kg	103.6±18.5	101.9±18.5	103.1±17.9	NS
BMI, kg/m ²	35.4±6.4	34.6±6.4	34.4±6.5	NS
AHI, eventi/ora	52.5±19.1	0.5±0.9	2.5±1.1	<0.0001
SaO ₂ minima, %	90.6±3.9	96.2±1.3	96.0±1.0	<0.0001
SaO ₂ piu bassa, %	66.4±8.8	89.6±3.4	89.3±1.5	<0.0001
EpworthSleepiness Scale(ESS) Score	12.6 ± 5.1	4.5±3.2	4.0±2.4	<0.0001
HOMA	4.13±2.19	3.49±2.15	4.18±2.79	NS
Trigliceridi, mg/dL	139±78	117 ± 34	134 ± 35	NS
Colesterolo totale, mg/dL	198±31	209±40	183±22	NS
Colesterolo-HDL, mg/dL	37.9±7.4	37.8±7.1	41.3 ± 9.6	NS
AST, IU/L	28.3±22.4	20.3±4.5	21.9±9.5	NS
ALT, IU/L	34.9±38.1	26.5±10.0	28.6±20.5	NS
Interleuchina-6, pg/ml	8.6±3.5	6.8±1.1	6.5±1.9	NS
Interleuchina-10, pg/ml	4.6±8.1	3.9±8.0	3.6±7.1	NS
Leptina, ng/ml	32.1±26.2	22.8±16.0	33.3±28.5	NS
Adiponectina, mg/ml	8.4±3.3	8.0±2.6	7.1±2.7	NS
TNF-alfa,pg/ml	8.0±1.9	7.9±1.2	7.6±1.3	NS

I dati sulla steatosi epatica mostravano un trend di miglioramento nel corso del trattamento con CPAP. La steatosi era invariata (n=5) o migliorata (n=5) nei 10 pazienti che avevano ridotto il BMI durante il follow up.(fig 14).

Figura 14. *Steatosi Epatica e BMI nel follow up*



Il Fibroscan era invece nel range di normalità in tutti i tempi osservati nei pazienti in cui è stato possibile effettuare la misurazione (6.55 ± 2.36 kPa alla diagnosi (n=11), 7.62 ± 2.8 kPa a 6 mesi (n=6), and 6.69 ± 1.29 kPa a 12 mesi (n=9), differenze NS) (fig 15) anche se mostrava una correlazione con i valori di obesità generale e viscerale (BMI e circonferenza vita). (fig16)

Figura15. *Fibrosi Epatica (Fibroscan®) dopo trattamento con CPAP*

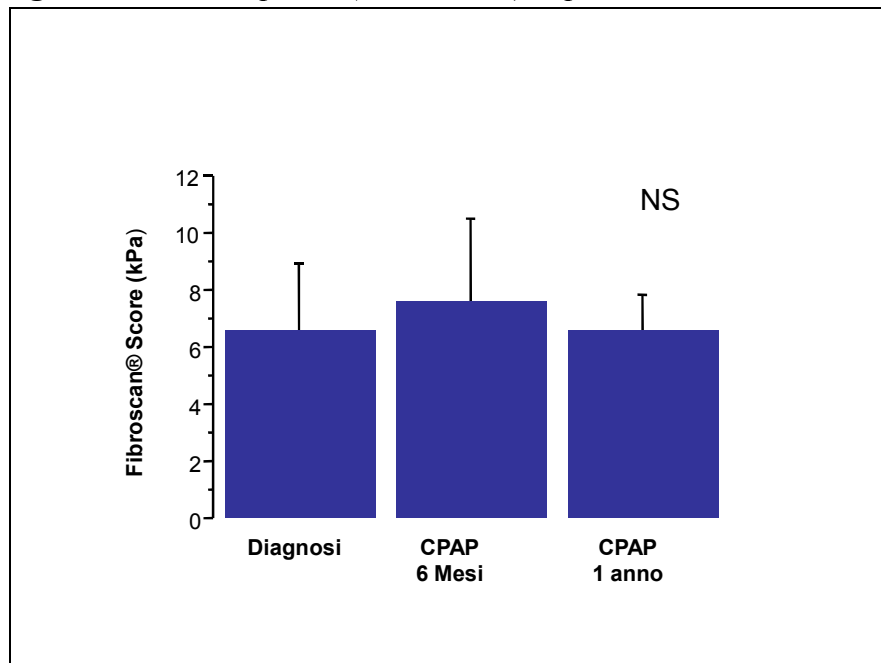
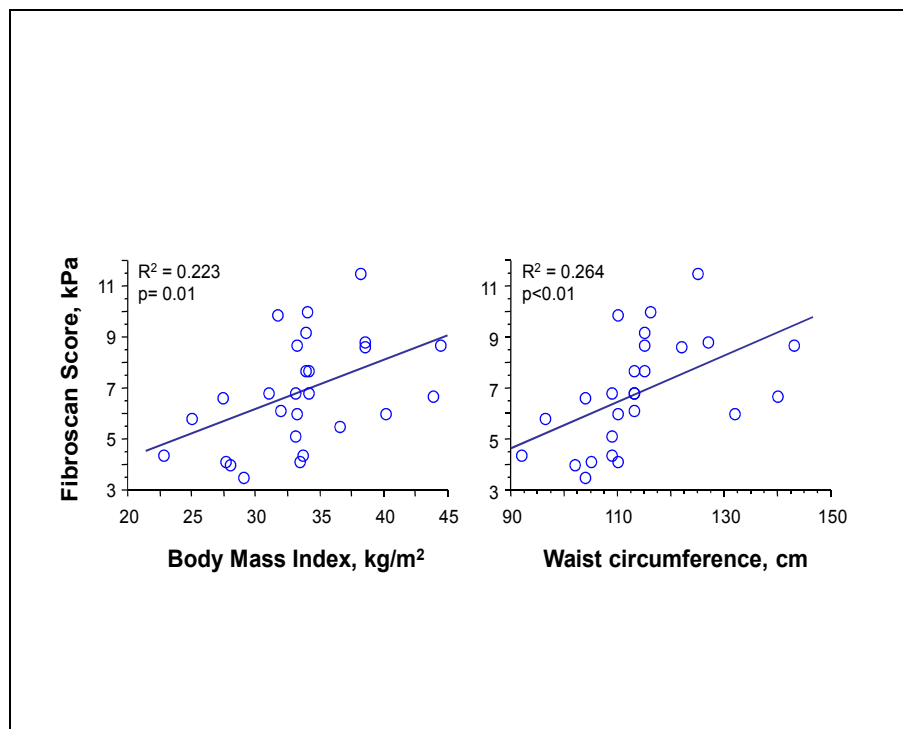


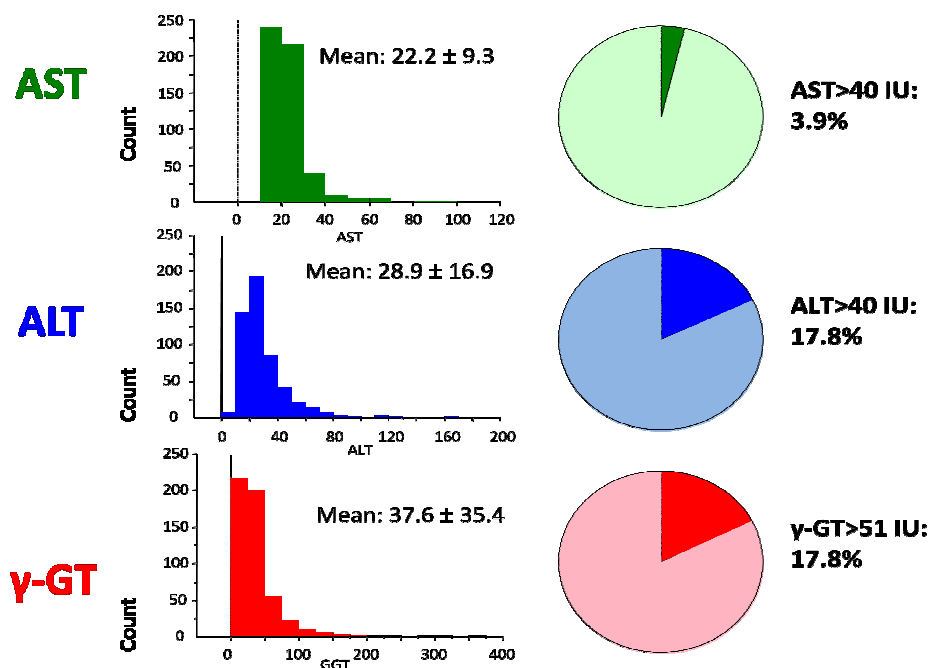
Figura 16: *Correlazione tra Fibroscan e obesità generale e viscerale*



Protocollo III: prevalenza delle anomalie degli enzimi di funzionalità epatica in una vasta popolazione di pazienti OSAS alla diagnosi

In questo vasto campione preso in esame è stata riscontrata una prevalenza di ALT e γ -GT pari al 17,8%, mentre l'AST risultava superiore al normale solo nel 3,9% dei pazienti (Fig.17).

Figura17: Prevalenza dell'aumento degli enzimi epatici nel campione in esame



Nella Tabella 11 sono riportate le caratteristiche antropometriche e le variabili correlate al sonno in relazione all'aumento o meno delle ALT. I pazienti con ALT aumentate tendevano ad essere più giovani, con grandi colli

e un alto indice metabolico (Tabella 12). Nessuna relazione tra elevati livelli di ALT e la gravità di ipossiemia notturna è stato mostrato in analisi multivariata

Tabella 11 . *Caratteristiche antropometriche e variabili correlate al sonno*

	All (n=522)	ALT≤40 (n=429)	ALT>40 (n=93)	P value
Age, yrs	51.2 ± 12.7	52.1 ± 13.1	47.3 ± 10.0	0.001
Sex, M/F	417/105	329/100	88/5	<0.0001
Weight, kg	88.0 ± 18.7	85.9 ± 17.8	97.8 ± 19.7	<0.0001
BMI, kg/m ²	30.9 ± 6.3	30.5 ± 6.3	32.9 ± 5.9	0.001
Neck, cm	41.6 ± 4.1	41.2 ± 4.2	43.6 ± 3.4	<0.0001
Waist, cm	107.1 ± 14.3	105.9 ± 14.3	112.8 ± 12.7	<0.0001
Waist-to-hip ratio	0.96 ± 0.08	0.95 ± 0.08	0.97 ± 0.06	0.01
AHI	43.3 ± 27.3	41.2 ± 26.3	52.7 ± 30.2	0.0002
Mean SaO ₂ %	90.4 ± 3.9	92.6 ± 3.8	91.0 ± 4.4	0.0005
Lowest SaO ₂ %	80.8 ± 9.2	81.3 ± 9.0	78.5 ± 9.7	0.01
ESS	9.7 ± 5.1	9.4 ± 5.1	11.2 ± 4.8	0.002

Tabella 12: *Variabili metaboliche*

	All (n=522)	ALT≤40 (n=429)	ALT>40 (n=93)	P value
Office SBP, mmHg	130.8 ± 17.0	129.7 ± 17.1	136.3 ± 15.3	0.0007
Office DBP, mmHg	79.6 ± 12.7	78.8 ± 12.1	83.5 ± 14.8	0.001
Hypertension (% of pts)	29.7(n=155)	31.5(n=135)	21.5(n=20)	NS
FBG mg/dL	105.8 ± 25.5	105.3 ± 25.8	107.9 ± 24.2	NS
Insulin, mU/L	13.9 ± 10.2	12.9 ± 9.8	18.3 ± 10.6	0.0002
HOMA-IR	3.77 ± 2.98	3.53 ± 2.93	4.85 ± 2.99	0.002
Tot cholesterol, mg/dL	204.4 ± 38.9	204.6 ± 39.1	203.5 ± 38.3	NS
Tryglicerides, mg/dL	153 ± 88	145 ± 79	189 ± 118	<0.0001
HDL-cholesterol,mg/dL	53.5 ± 18.0	54.9 ± 19.0	46.6 ± 10.4	<0.0001
MetS (% of pts)	43.7	40.6	58.0	0.002

Sebbene l'ALT e γ -GT aumentino con l'aumentare della severità dell'OSAS (Fig.18), né l'AHI né la SaO₂ sono risultati all'analisi multivariata (v. oltre) significativamente associati con i livelli sierici di ALT (Fig. 19), suggerendo un ruolo predominante dell'obesità e delle alterazioni metaboliche, piuttosto che un effetto rilevante dell'OSAS, sugli enzimi epatici. L'analisi multivariata ha fornito i seguenti risultati:

- Variabile dipendente: **ALT**, variabili indipendenti: età, BMI, circonferenza collo, Indice Metabolico, AHI, SaO₂min. R²: 0.135 R: 0.367 n=479 p<0.0001 Variabili significative: età (inversa), circonferenza collo, Indice Metabolico.

Risultati simili dopo esclusione dei pazienti diabetici (n=439): R²: 0.147 R: 0.384 p<0.0001

- Variabile dipendente: **gammaGT**, variabili indipendenti: circonferenza collo, circonferenza vita, Indice Metabolico, AHI, SaO₂min. R²: 0.060 R: 0.246, n=478, p<0.0001. Variabili significative: circonferenza collo e SaO₂min

Figura18: *Enzimi epatici e severità dell'OSA*

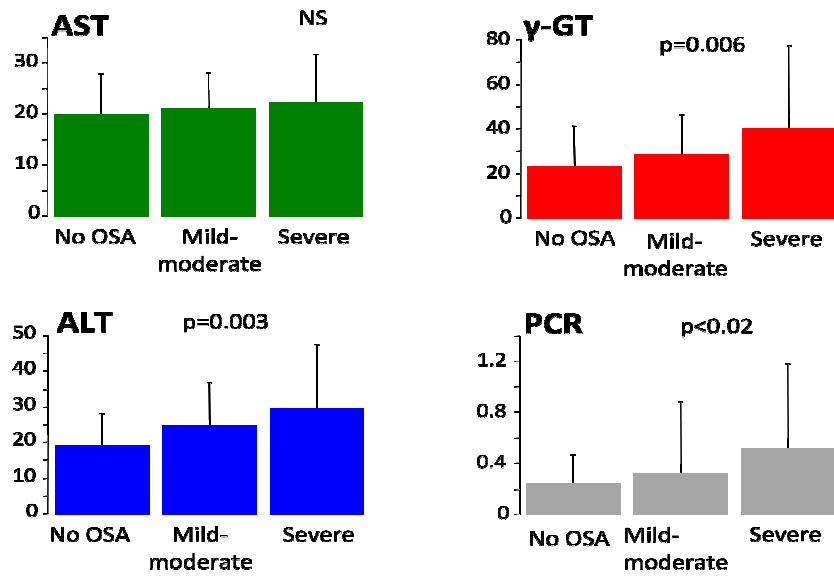
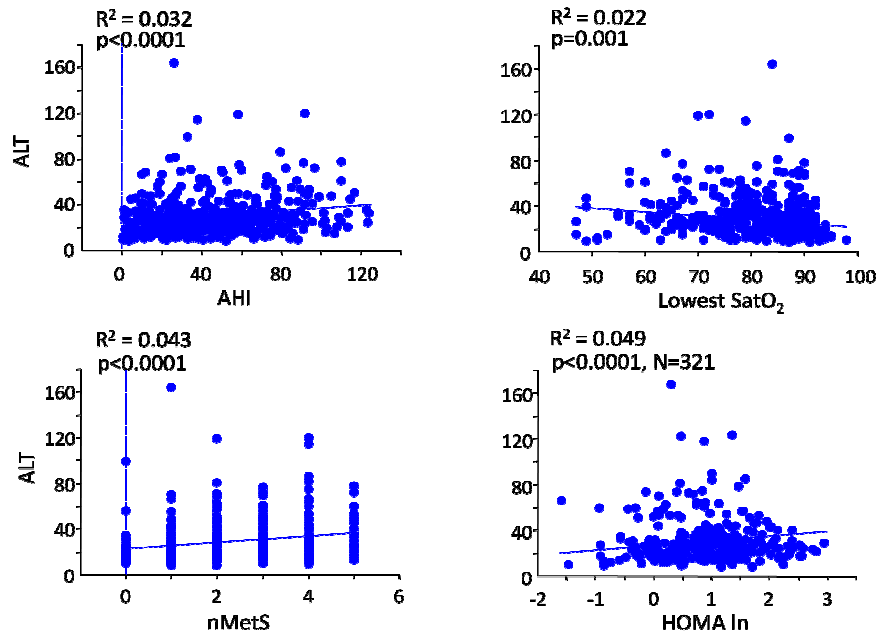


Figura 19: *Analisi univariata tra i livelli sierici di ALT e AHI, SaO₂, HOMA e SMet*



La scoperta riportata da Kanbay et al su Respiratory Medicine (206) che γ -GT potrebbe essere più sensibile di ALT nel rilevare danni al fegato nei pazienti con OSAS è stata in parte confermata, poiché γ -GT è risultata correlata in modo indipendente con la più bassa SaO₂ ma l'analisi multivariata complessiva aveva una significatività inferiore rispetto ad ALT. Concludendo, gli enzimi epatici devono essere misurati nei pazienti con grave OSAS, soprattutto se sono giovani e obesi con grandi colli.

Protocollo IV: associazione tra OSAS e indici di saturazione di O₂ con gravità della fibrosi epatica e aterosclerosi carotidea in pazienti con NAFLD

Dei 126 pazienti consecutivi con NAFLD che hanno risposto al questionario di STOP-BANG e sono stati sottoposti a ecografia della carotidee a biopsia epatica, 76 pazienti (pari al 60%) hanno rifiutato lo studio del sonno, mentre 50 pazienti sono stati sottoposti a monitoraggio cardiorespiratorio. Tra i pazienti che hanno aderito allo studio del sonno, l'OSAS è stata diagnosticata in un paziente su due, anche se era grave solo nel 20% dei casi. In particolare, tutti i pazienti con OSAS erano nel gruppo ad alto rischio secondo il questionario STOP-BANG, ma il questionario ha correttamente identificato solo il 65% dei pazienti con OSAS mostrando una sensibilità del 100% e una specificità del 48%. I pazienti che hanno accettato lo studio notturno avevano una maggiore prevalenza di comorbidità metaboliche come l'obesità, l'ipertensione e il diabete, anche se la prevalenza di alto rischio per OSAS valutato con il questionario STOP-BANG è risultata simile nei due gruppi, così come il grado di danno epatico in termini di steatosi, infiammazione lobulare, ballooning, NASH e fibrosi.

Tra i pazienti con studio del sonno, l'età media era di 53 anni, e c'era una leggera prevalenza dei maschi (58%). La maggior parte dei pazienti avevano obesità viscerale, uno su due era iperteso, e il diabete era presente nel 40% dei soggetti. Alla biopsia epatica, circa un paziente su due ha avuto diagnosticato la fibrosi \geq 2 per il punteggio Kleiner, mentre due su tre hanno avuto diagnosi di

NASH. Le caratteristiche dei pazienti in base alla presenza o meno di OSAS sono riportati nella tabella 13.

Tabella 13. *Caratteristiche dei pazienti in base alla presenza o meno di OSAS*

Variable	AHI<5 n=25	AHI≥5 n=25	P value
Mean Age – years	49.6 ± 11.7	56.1 ± 9.1	0.03
Male Gender	56%	60%	0.77
BMI	29.0 ± 3.6	33.5 ± 4.7	<0.001
Waist Circumference – cm	101.6 ± 9.2	111.7 ± 11.4	0.001
Visceral Obesity	68%	92%	0.03
ALT– IU/MI	63.6 ± 34.5	66.5 ± 33.4	0.76
Blood glucose – mg/dl	97.0 ± 20.7	119.1 ± 38.8	0.01
HOMA	4.07 ± 2.17	4.78 ± 2.75	0.32
Type 2 Diabetes	20%	60%	0.004
Arterial Hypertension	20%	80%	<0.001
Metabolic Syndrome	24%	56%	0.02
Intima Media Thickness - mm	0.82 ± 0.18	0.83 ± 0.14	0.73
Carotid Plaques	40%	64%	0.08
AHI medianlevels (95% C.I.)	2 (0-5)	11 (6-52)	<0.001
SaO2 mean levels	94.8 ± 1.3	92.9 ± 2.2	0.001
SaO2 mean levels <95%	28%	84%	<0.001
T90 medianlevels (95% C.I.)	0 (0-3)	3 (0-57)	<0.001
T90 >1%	16%	56%	0.003
ODI median levels (95% C.I.)	3.1 (0.3-6.3)	13.3 (6.5-42.7)	<0.001
Histology			
Lobular inflammation 2-3	44%	43.4%	0.97
Steatosis grade3 (>66%)	20%	34.7%	0.25
Balloning	64%	91%	0.02
NASH	60%	88%	0.02
Fibrosis Stage 2-4	44%	72%	0.04

Come atteso, pazienti con OSAS erano più anziani e avevano una maggiore prevalenza di obesità, ipertensione e diabete rispetto a quelli senza OSA ($p < 0,05$ per tutti). Quando si considerano parametri di saturazione di ossigeno, i pazienti con OSAS avevano una SaO_2 inferiore e superiore T_{90} ($p < 0,01$ per entrambi). In particolare, nessuna differenza in termini di sonnolenza è stata osservata tra i pazienti con e senza OSA.

La gravità del danno epatico è risultata associata ad alto rischio di OSAS e a SaO_2 inferiore rispetto ai pazienti con basso rischio di OSAS. In tutta la coorte di 126 pazienti, la prevalenza di fibrosi F2-F4 era maggiore nei pazienti ad alto rischio rispetto a quelli non ad alto rischio di OSAS (80,6% vs 57,8%, $p = 0,006$), questa associazione rimaneva marginalmente significativa dopo aggiustamento per fattori confondenti (OR 2.25, 95% CI 0,97-5,22; $p = 0,05$) (Tabella 14 sopra).

Considerando i pazienti sottoposti a studio del sonno, i soggetti con fibrosi F2-F4, rispetto alle loro controparti con fibrosi F0-F1, mostravano una prevalenza significativamente più alta di $AHI \geq 5$ (72% vs. 44%; $p = 0,04$), nonché di $SaO_{2\text{media}} < 95\%$ (69% vs. 38%; $p = 0,03$), ma non di $T_{90} > 1\%$ (44% vs. 24%; $p = 0,12$). Da segnalare la perdita di associazione tra la fibrosi e OSAS dopo la correzione per fattori confondenti (OR 1,60, 95% CI 0,33-7,66; $p = 0,55$), mentre quella con la $SaO_{2\text{media}} < 95\%$ è stata mantenuta (OR 3.21, 95% CI 1,02-7,34; $p = 0,04$) (Tabella 14, sotto).

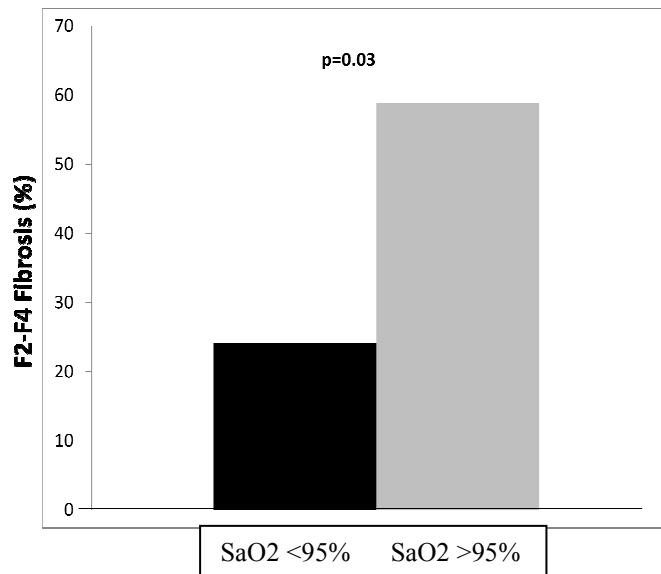
Tabella 14. *Analisi univariata e multivariate dei fattori associata a Fibrosi F2-F4 nei 126 pazienti con NAFLD sottoposta a questionario STOP BANG (sopra) e nei 50 pazienti con NAFLD sottoposta a studio del sonno (sotto)*

Variable	Unadjusted Model		Adjusted Model	
Waist Circumference – cm	1.05 (1.01-1.09)	0.003	1.03 (0.99-1.07)	0.07
HOMA	1.38 (1.12-1.70)	0.002	1.23 (0.99-1.54)	0.06
High Risk OSA	3.04 (1.36-6.78)	0.007	2.25 (0.97-5.22)	0.05

Variable	Unadjusted Model		Adjusted Model		Adjusted Model		Adjusted Model	
Male gender	1.32 (0.42-4.14)	0.63	1.05 (0.23-4.78)	0.94	0.82 (0.19-3.54)	0.79	0.91 (0.21-3.93)	0.89
Age – yrs	1.12 (1.04-1.20)	0.001	1.14 (1.04-1.25)	0.005	1.13 (1.03-1.23)	0.005	1.13 (1.03-1.23)	0.004
Waist Circumference– cm	1.03 (0.98-1.09)	0.15	0.98 (0.91-1.06)	0.71	0.99 (0.92-1.07)	0.97	0.99 (0.92-1.07)	0.92
HOMA	1.33 (1.00-1.77)	0.04	1.49 (1.01-2.20)	0.04	1.39 (0.99-1.95)	0.05	1.41 (1.01-2.07)	0.04
AHI ≥5	3.27 (1.00-10.6)	0.04			1.60 (0.33-7.66)	0.55		
SaO2 mean levels <95%	3.61 (1.10-11.7)	0.01	3.21 (1.02-7.34)	0.04				
T90 >1%	2.83 (0.87-9.13)	0.08					2.43 (0.53-11.2)	0.25

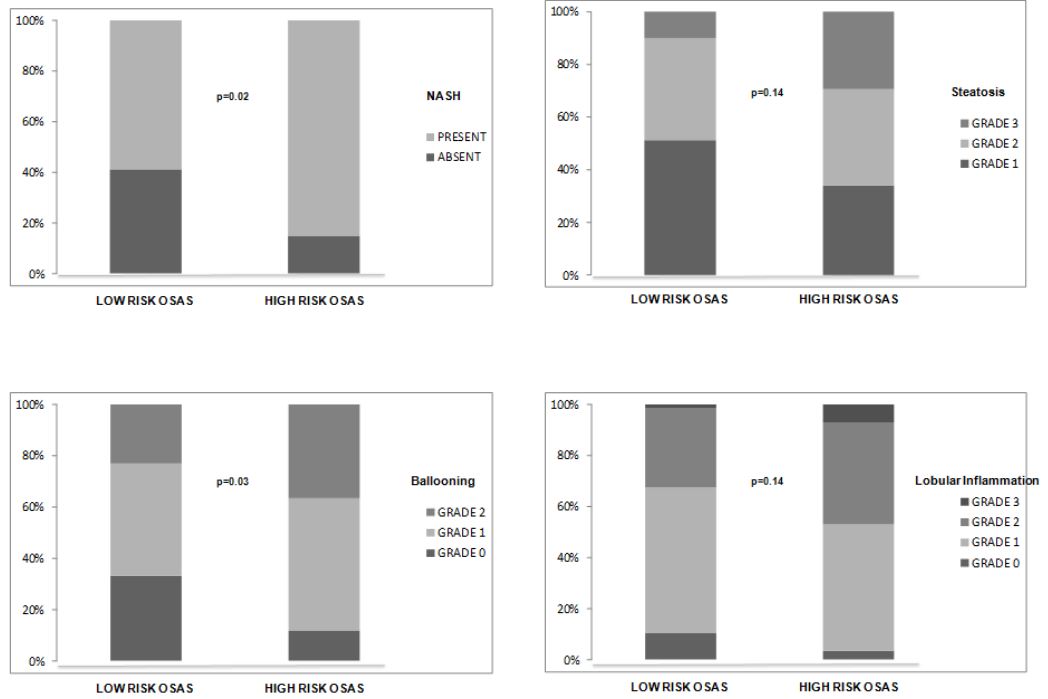
La figura 20 mostra una prevalenza significativa di fibrosi secondo il livello medio di SaO2 <95%.

Figura 20. Prevalenza della fibrosi secondo il livello medio di SaO2<95%



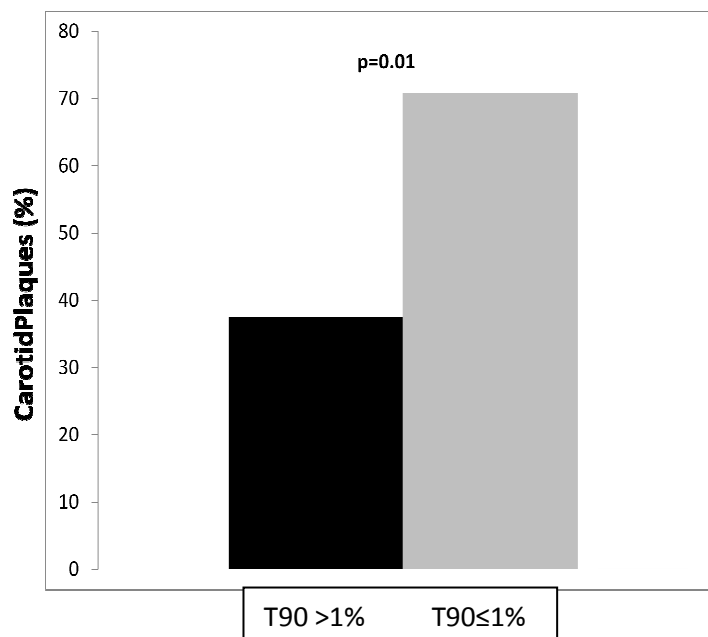
Quando si considera in tutta la coorte di 126 pazienti la presenza di NASH, e la gravità della steatosi, ballooning e infiammazione lobulare, dopo aggiustamento per la circonferenza vita e l'HOMA, un'associazione indipendente è stata osservata tra alto rischio di OSAS ed entrambi NASH ($p = 0.02$) e ballooning ($p = 0.03$) (figura 21).

Figura 21. Associazione tra rischio di OSAS e presenza di NASH, gravità della steatosi, ballooning e infiammazione lobulare nei 126 pazienti



La presenza di placche carotidee è risultata associata ad alto rischio di OSAS e a più bassa SaO₂. Tra i pazienti sottoposti a studio del sonno, i soggetti con placche carotidee hanno mostrato una prevalenza leggermente superiore di OSAS (64% vs 40%; p = 0,08) e di livelli medi di SaO₂<95% (68% vs 44%; p = 0,09). In particolare, dopo la correzione per fattori confondenti, l'associazione tra placche carotidee e OSAS (OR 1.14, 95% CI 0,18-6,99; p = 0,88) e SaO₂media <95% (OR 0,95, 95% CI 0,16-5,67; p = 0,96) è stata completamente persa, mentre quella con T₉₀> 1% è stata mantenuta (OR 6.30, 95% CI 1,02-12,3; p = 0.01) (tabella 14 sotto). La Figura 22 mostra la prevalenza di placche carotidee secondo T₉₀> 1%. Tuttavia quando IMT è stata analizzata come variabile continua, nessuna associazione è stata trovata con OSAS o indici di SaO₂.

Figura 22. Prevalenza di placche carotidee secondo T₉₀> 1%.



5.4 Discussione e Conclusioni

I risultati di questa tesi, sviluppata in quattro distinti procolli sperimentali suggeriscono che il danno epatico nei pazienti OSAS, considerato come aumento di ALT sierica, è soprattutto associato ad insulino-resistenza (misurata mediante l'indice HOMA) ed al BMI, mentre non appaiono significative le correlazioni con gli indicatori della gravità dell'OSAS. I pazienti OSAS mostravano steatosi epatica di grado moderato-severo, ma la stima della fibrosi epatica mediante Fibroscan non ha evidenziato valori patologici nella nostra popolazione di pazienti ambulatoriali. Diversi studi clinici e sperimentali indicano che l'ipossia intermittente notturna è associata ad insulino-resistenza indipendentemente dalla coesistenza di obesità (207,208), suggerendo che l'OSAS possa avere effetti deleteri sul metabolismo che si sommano agli effetti dell'obesità. Anche nel caso del danno epatico, alcuni studi suggeriscono che l'ipossia intermittente notturna causi la progressione della steatosi epatica in steatoepatite (studi su biopsie). Lo studio di Norman e collaboratori (205) ha documentato una relazione lineare tra gravità dell'ipossiemia notturna e aumento di ALT nel siero di pazienti OSAS. Complessivamente, questi dati suggeriscono che l'OSAS potrebbe contribuire sia al "first hit" che al "second hit" ipotizzati nella patogenesi del danno epatico della NASH.

Una possibile spiegazione della differenza tra i dati in letteratura ed i nostri risultati è che la maggior parte degli studi hanno esaminato il danno epatico su materiale biotico ottenuto in grandi obesi durante chirurgia bariatrica. Poiché nel contesto clinico usuale dei pazienti OSAS non si può ottenere materiale biotico epatico per motivi etici, è possibile che i dati delle transaminasi sieriche

sottostimino la reale prevalenza della steatoepatite nei nostri pazienti, visto che è noto che ALT è un indicatore di danno epatico poco sensibile nella NASH. A causa di questo limite, abbiamo eseguito in un piccolo campione di pazienti OSAS anche studi non invasivi del fegato, allo scopo di ottenere maggiori informazioni attraverso marcatori clinici più sensibili delle transaminasi. I nostri risultati preliminari in tale campione numericamente limitato non confermano i dati ottenuti in pazienti con obesità severa studiati mediante biopsia epatica prelevata in corso di chirurgia bariatrica. E' possibile che nei pazienti con obesità severa la prevalenza di steatoepatite sia maggiore rispetto a quanto evidenziato nella nostra popolazione ambulatoriale con sintomi di OSAS. In alternativa, il Fibroscan potrebbe non essere sufficientemente sensibile nella diagnosi non invasiva della fibrosi epatica, anche se ciò non risulta dagli studi disponibili sull'argomento (209,210). Va comunque sottolineato che la diagnosi definitiva di steatoepatite è tuttora ottenuta mediante biopsia epatica, e i nostri dati sono da interpretare soltanto come suggestivi dell'assenza di un grado significativo di fibrosi epatica nei nostri pazienti.

Pur con queste limitazioni, il nostro studio indica un'alta prevalenza di steatosi epatica nei pazienti OSAS valutati mediante ecografia. Poiché la steatosi epatica è spesso associata ad insulino-resistenza, i nostri risultati suggeriscono che il danno epatico non sia espressione diretta dell'obesità in quanto tale, ma si verifichi soltanto nel contesto di una obesità viscerale. Infatti, i nostri pazienti con ALT aumentata mostravano un valore di HOMA Index nettamente maggiore dei pazienti con ALT normale, pur in presenza di una debole correlazione col grado di obesità valutato come BMI. Non si può escludere che fattori di

suscettibilità individuale, su base genetica, possano intervenire nella determinazione del fenotipo di pazienti OSAS obesi e con indicatori positivi di danno epatico. Tale fenotipo è probabilmente correlato alla presenza di sindrome metabolica, come suggerito dall'elevata prevalenza di obesità, ipertensione e dislipidemia nel nostro campione di pazienti. La sindrome metabolica nei pazienti OSAS mostra una prevalenza almeno doppia rispetto alla popolazione generale (211), e secondo alcuni Autori l'OSAS sarebbe una componente fondamentale della sindrome stessa (212). Peraltro, la steatosi epatica è risultata nel nostro campione molto più frequente dell'aumento degli enzimi epatici, in particolare tutti i pazienti con aumento di ALT mostravano steatosi epatica severa, ma quest'ultima era altrettanto frequente anche nel gruppo senza aumento di ALT. Dal punto di vista clinico, sembra pertanto più utile eseguire una ecografia epatica che misurare gli enzimi epatici.

Per quanto riguarda gli effetti del trattamento con CPAP sulla steatosi epatica il nostro studio suggerisce che in pazienti con obesità da moderata a grave vi è un effetto positivo della terapia, confermando i risultati dello studio di Shpirer e collaboratori (213). È interessante notare che un miglioramento significativo del grado medio di steatosi è stato osservato nonostante l'assenza di variazioni significative del BMI medio dopo il trattamento con CPAP. Questi risultati suggeriscono che il trattamento con CPAP nei pazienti con OSA grave potrebbe esercitare un effetto protettivo contro lo sviluppo di danno epatico. Il recente studio di Minville e collaboratori (194) ha indicato un ruolo significativo dell'ipossia intermittente sulla steatosi epatica, ma il nostro piccolo campione di studio non ha permesso di verificare il ruolo relativo dell'AHI nei confronti

dell'ipossia intermittente, valutata come SaO₂ più bassa o come tempo trascorso con una SaO₂ <90%.

I risultati negativi della valutazione con Fibroscan® score meritano di essere commentati. L'obesità severa è un noto fattore responsabile del fallimento del metodo dell' elastografia transitoria quando si utilizza una sonda "media" (214). Infatti non è stato possibile ottenere la misurazione con il FibroScan in 4 soggetti gravemente obesi, in linea con il tasso di fallimento del 25% riportato da altri studi (215). Rispetto ai risultati degli studi eseguiti con biopsia epatica in pazienti con obesità patologica, la fibrosi epatica è risultata non comune nei nostri pazienti con OSA, come anche riportato da Minville e collaboratori (194). Il ritrovamento di alti valori al FibroScan in pazienti con il più alto indice di massa corporea suggerisce che un modesto grado di fibrosi epatica nel nostro campione potrebbe presentarsi in pazienti gravemente obesi, in accordo con il loro maggiore rischio di steatoepatite. Nonostante il grande limite dovuto alle piccole dimensioni del campione, i punti di forza di questo studio sono che abbiamo escluso altre cause di NAFLD, nessun paziente era in trattamento per la dislipidemia e / o diabete, e la valutazione del fegato è stata eseguita da gastroenterologi esperti. In conclusione, la valutazione ecografica della NAFLD è fattibile nella maggior parte dei pazienti con OSA visti nelle cliniche e offre il vantaggio di essere facilmente ripetibile durante il follow-up. I risultati suggeriscono che la steatosi epatica migliora durante il trattamento con CPAP a lungo termine.

Sicuramente il gold standard per la diagnosi di NAFLD rimane la biopsia. Nel quarto protocollo abbiamo sottoposto a monitoraggio cardiorespiratorio

pazienti con diagnosi di NAFLD su biopsia con evidenza di una prevalenza di OSAS del 50%. A nostra conoscenza questo è il primo studio che mostra un'associazione indipendente tra valori medi di SaO₂ notturna <95% e significativa fibrosi epatica nei pazienti con NAFLD diagnosticata con biopsia in pazienti a bassa prevalenza di obesità patologica. In realtà, fino ad ora sono state condotte osservazioni simili solo in coorti di pazienti obesi (193,198-200) e in uno studio sui bambini con NAFLD (216).

Pazienti con NAFLD sono noti per essere ad alto rischio di disfunzioni vascolari e aterosclerosi carotidea a causa dell'elevata prevalenza di comorbidità metaboliche e allo squilibrio pro-aterogeno e pro-coagulante che caratterizza questi pazienti (217). Nel nostro campione di pazienti con NAFLD, e un alto rischio di OSA e un T90 > 1% erano indipendentemente associati con aterosclerosi carotidea subclinica in termini di maggiori IMT carotidea e placche. Così dunque i nostri dati suggeriscono che nei pazienti con NAFLD, l'OSAS potrebbe contribuire alla progressione delle lesioni aterosclerotiche, probabilmente attraverso l'esposizione notturna all'ipossia. Il nostro studio è la prima segnalazione di tale associazione in pazienti con NAFLD a bassa prevalenza di obesità grave.

Da un punto di vista clinico il nostro studio suggerisce di valutare in modo non invasivo il rischio di OSAS anche in pazienti con NAFLD senza obesità patologica utilizzando un approccio a due step, cioè di sottoporre a studio del sonno i pazienti positivi al questionario di STOP-BANG, in quanto il questionario da solo sovrastima il rischio di OSAS, e la sonnolenza non ci permette di discriminare i pazienti con OSAS da quelli senza. L'identificazione

di pazienti con NAFLD e OSAS ed il trattamento dell'OSAS potrebbero influenzare positivamente il metabolismo e possibilmente anche le alterazioni epatiche.

In conclusione, in una coorte di pazienti con NAFLD a bassa prevalenza di obesità patologica, abbiamo dimostrato che l'OSAS è prevalente e che gli indici di SaO₂ sono indicatori indipendenti della gravità del danno epatico e del rischio di aterosclerosi carotidea. Questi dati, se ulteriormente convalidati, potrebbero suggerire di cercare l' OSAS in tutti i pazienti con NAFLD, poiché OSAS è curabile e può rappresentare un potenziale ulteriore bersaglio terapeutico per la NAFLD.

Bibliografia

1. Dempsey JA, Xie A, Patz DS, Wang D. Physiology in medicine: obstructive sleep apnea pathogenesis and treatment--considerations beyond airway anatomy. *J Appl Physiol* 2014; 116: 3-12
2. Naresh M. Punjabi. The Epidemiology of Adult Obstructive Sleep Apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 136–143.
3. Young T, Palta M, Dempsey J et al. The occurrence of sleep disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993; 328:1230-1235
4. Bearpark H, Elliott L, Grunstein R, Cullen S, Schneider H, Althaus W, Sullivan C. Snoring and sleep apnea: a population study in Australian men. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1459–1465.
5. Bixler EO, Vgontzas AN, Ten Have T, Tyson K, Kales A. Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 144–148.
6. Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, Kales A. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 608–613
7. Duran J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 685–689.
8. Ip MS, Lam B, Lauder IJ, Tsang KW, Chung KF, Mok YW, Lam WK. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese men in Hong Kong. *Chest* 2001; 119: 62–69.
9. Ip MS, Lam B, Tang LC, Lauder IJ, Ip TY, Lam WK. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese women in Hong Kong: prevalence and gender differences. *Chest* 2004; 125: 127–134.
10. Kim J, In K, Kim J, You S, Kang K, Shim J, Lee S, Lee J, Lee S, Park C, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1108–1113.
11. Udawadia ZF, Doshi AV, Lonkar SG, Singh CI. Prevalence of sleep disordered breathing and sleep apnea in middle-aged urban Indian men. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 168–173.
12. Bearpark H, Elliott L, Grunstein R, Cullen S, Schneider H, Althaus W, Sullivan C. Snoring and sleep apnea. A population study in Australian men. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151: 1459–1465.
13. Strohl KP, Redline S. Recognition of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154: 279–289.
14. Barvaux VA, Aubert G, Rodenstein DO. Weight loss as a treatment for obstructive sleep apnoea. *Sleep Med Rev* 2000;4:435–452
15. Fritscher LG, Mottin CC, Canani S, Chatkin JM. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: the impact of bariatric surgery. *Obes Surg* 2007;17:95–99
16. Grunstein RR, Stenlof K, Hedner JA, Peltonen M, Karason K, Sjoström L. Two year reduction in sleep apnea symptoms and associated diabetes incidence after weight loss in severe obesity. *Sleep* 2007;30:703–710.
17. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 2000; 284: 3015–

3021.

18. Young T, Shahar E, Nieto FJ, Redline S, Newman AB, Gottlieb DJ, Walsleben JA, Finn L, Enright P, Samet JM. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 2002; 162: 893–900.
19. Svansson M, Lindberg E, Naessen T, Janson C. Risk factors associated with snoring in women with special emphasis on body mass index: a population-based study. *Chest* 2006 129: 933-41.
20. McNicholas WT. Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:154-160.
21. Ohayon MM, Guilleminault C, Priest RG, Caulet M. Snoring and breathing pauses during sleep: telephone interview survey of a United Kingdom population sample. *BMJ* 1997; 314: 860-863.
22. Viner S, Szalai JP, Hoffstein V. Are history and physical examination a good screening test for sleep apnea? *Ann Intern Med* 1991;115: 356–359
23. Deegan PC, McNicholas WT. Predictive value of clinical features for the obstructive sleep apnoea syndrome. *EurRespir J* 1996; 9: 117–124.
24. Hoffstein V, Szalai JP. Predictive value of clinical features in diagnosing obstructive sleepapnea. *Sleep* 1993; 16: 118–122.
25. Krieger J, Imbs JL, Schmidt M et al. Renal function in patients with obstructive sleep apnea. Effects of nasal continuous positive airway pressure. *Arch Intern Med* 1988; 148: 1337-1340.
26. Krieger J, Follenius M, Sforza E et al. Effects of treatment with nasal continuous positive airway pressure on atrial natriuretic peptide and arginine vasopressin release during sleep in obstructive sleep apnea. *ClinSci* 1991; 80: 443-449.
27. Follenius M, Krieger J, Krauth MO et al. Obstructive sleep apnea treatment. Peripheral and central effects on plasma renin activity and aldosterone. *Sleep* 1991; 14: 211-217.
28. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J RespirCrit Care Med* 2002; 165: 1217–1239.
29. Flemons WW, Mc-Nicholas WT. Clinical prediction of the sleep apnea syndrome. *Sleep Med Rev* 1997; 1:19-32
30. Kiely JL, McNicholas WT. Cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *EurRespir J* 2000; 16: 128–133
31. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991; 14: 540–545
32. Bixler, E.O. Excessive daytime sleepiness in a general population sample: the role of sleep apnea, age, obesity, diabetes and depression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 200590: 4510-4515.
33. Practice Committee of the American Sleep Disorders Association. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures. *Sleep* 1997;20:406–422.
34. American Academy of Sleep Medicine Task Force. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep* 1999; 22: 667–689.

35. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Lloyd RM, Marcus CL and Vaughn BV for the American Academy of Sleep Medicine. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.0.3. www.aasmnet.org, Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2014.
36. Polo O. Continuous positive airway pressure for treatment of sleep apnoea. *Lancet* 1999; 353: 2086-2087
37. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000; 342: 1378–1384.
38. Peker Y, Carlson J, Hedner J. Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *EurRespir J* 2006; 28: 596–602.
39. Davies RJO. Cardiovascular aspects of obstructive sleep apnoea and their relevance to the assessment of the efficacy of nasal continuous positive airway pressure therapy. *Thorax* 1998; 53:416-418
40. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study.*Lancet* 2005, 365: 1046-1053
41. Shamsuzzaman ASM, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea- Implications for cardiac and vascular disease. *JAMA* 2003; 290: 1906-1914
42. Punjabi NM, Newman AB, Young TB, Resnick HE, Sanders MH. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: an outcomebased definition of hypopneas. *Am J RespirCrit Care Med* 2008; 177: 1150–1155.
43. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2660-7
44. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.
45. Granger DN, Rutili G, McCordJM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22–29
46. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome – an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 2003; 7: 35–51.
47. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2004; 27: 123–128.
48. Barcelo A, Miralles C, Barbe F, et al. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *EurRespir J*2000; 16: 644–647
49. Glass CK and Witztum JL. “Atherosclerosis: the road ahead.”*Cell* 2001; 104: 503-516
50. Ip MS, Lam B, Chan LY, Zheng L, Tsang KW, Fung PC, Lam WK. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J RespirCrit Care Med* 2000; 162: 2166–2171
51. Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, Seeger W, Grimminger F. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J RespirCrit Care Med* 2000; 162: 566-570

52. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 269–285
53. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95
54. Lavie L. Intermittent hypoxia: the culprit of oxidative stress, vascular inflammation and dyslipidemia in obstructive sleep apnea. *Expert Rev Respir Med* 2008; 2:75–84
55. Williams A, Scharf S. Obstructive sleep apnea, cardiovascular disease, and inflammation—is NF- κ B the key? *Sleep and Breathing* 2007; 11:69–76
56. Schafer H, Pauleit D, Sudhop T, Gouni-Berthold I, Ewig S, Berthold HK. Body fat distribution, serum leptin, and cardiovascular risk factors in men with obstructive sleep apnea. *Chest* 2002; 122:829–839
57. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 824-830.
58. Ciftci TU, Kokturk O, Bukan N, Bilgihan A. The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *Cytokine* 2004; 28: 87–91
59. Ridker PM, Cook N. clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham risk scores. *Circulation* 2004; 109:1955-1959
60. Ford ES. The metabolic syndrome an C-reactive protein, fibrinogen and leukocyte count: Findings from the third national health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2003; 168: 351-358.
61. Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, Accurso V, Somers VK. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2002; 105: 2462–2464.
62. Ryan S, Nolan GM, Hannigan E, Cunningham S, Taylor C, McNicholas WT. Cardiovascular risk markers in obstructive sleep apnoea syndrome and correlation with obesity. *Thorax* 2007; 62: 509–514.
63. Friedman M, Samuelson CG, Hamilton C, Fisher M, Kelley K, Joseph NJ, Wang PC, Lin HC. Effect of continuous positive airway pressure on C-reactive protein levels in sleep apnea: a meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012; 147: 423-433.
64. Gavins F, Yilmaz G, Granger DN. The evolving paradigm for blood cell–endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation. *Microcirculation* 2007; 14: 667–681
65. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24–38.
66. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P, LeJemtel TH. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008; 117: 2270–2278.
67. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; NHLBI, American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; NHLBI; AHA; WHF; IAS; and IASO. *Circulation*. 2009 Oct 20; 120(16):1640-5.

68. Simmons RK, Alberti KG, Gale EA, Colagiuri S, Tuomilehto J, Qiao Q, Ramachandran A, Tajima N, BrajkovichMirchov I, Ben-Nakhi A, Reaven G, Hama Sambo B, Mendis S, Roglic G. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia* 2010; 53: 600–605.
69. Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE. Sleep Heart Health Study Investigators. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 2004;160:521–530.
70. Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, Young T. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am J RespirCrit Care Med* 2005;172:1590–1595.
71. Botros N, Concato J, Mohsenin V, Selim B, Doctor K, Yaggi HK. Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes. *Am J Med* 2009; 122:1122–1127.
72. Togeiro SM, Carneiro G, RibeiroFilho FF, et al. Consequences of obstructive sleep apnea on metabolic profile: a population-based survey. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21: 847–851.
73. Lam JC, Lam B, Lam CL, Fong D, Wang JK, Tse HF, Lam KS, Ip MS. Obstructive sleep apnea and the metabolic syndrome in community-based Chinese adults in Hong Kong. *Respir Med* 2006;100:980-987.
74. Sasanabe R, Banno K, Otake K, Hasegawa R, Usui K, Morita M, Shiomi T. Metabolic syndrome in Japanese patients with obstructive sleep apneasyndrome. *Hypertens Res* 2006; 29: 315-322
75. Wilcox I, McNamara SG, Collins FL, et al. "Syndrome Z": the interaction of sleep apnoea, vascular risk factors and heart disease. *Thorax* 1998; 53: Suppl. 3, S25–S28.
76. Vgontzas AN, Bixler EO, Chrousos GP. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 211–224
77. Drager LF, Bortolotto LA, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Alves MJ, Fraga RF, Negrão CE, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. The incremental role of obstructive sleep apnoea on markers of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2010;208:490-495.
78. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ, Fraga RF, Jun JC, Negrão CE, Krieger EM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One* 2010;5:e12065.
79. Trombetta IC, Somers VK, Maki-Nunes C, Drager LF, Toschi-Dias E, Alves MJ, Fraga RF, Rondon MU, Bechara MG, Lorenzi-Filho G, Negrão CE. Consequences of comorbid sleep apnea in the metabolic syndrome -implications for cardiovascular risk. *Sleep* 2010;33:1193-1199.
80. M.R. Bonsignore et al. Metabolic Syndrome, Insulin Resistance and Sleepiness in Real-Life Obstructive Sleep Apnea. ERJ-01511-2010
81. Shiina K, Tomiyama H, Takata Y et al. concurrent presence of metabolic syndrome in obstructive sleep apnea Syndrome exacerbates the cardiovascular risk: a sleep clinic cohort study. *Hypertens Res* 2006; 29: 433–441
82. Stamatakis KA, Punjabi NM. Effects of sleep fragmentation on glucose metabolism in normal subjects. *Chest.* 2010; 137: 95–101
83. Tasali E, Leproult R, Ehrmann DA, Van CE. Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. *Proc NatlAcadSci USA.* 2008; 105: 1044–1049.
84. Larsen JJ, Hansen JM, Olsen NV, Galbo H, Dela F. The effect of altitude hypoxia on glucose homeostasis in men. *J Physiol*1997; 504: 241–249.

85. Barnholt KE, Hoffman AR, Rock PB, Muza SR, Fulco CS, Braun B, et al. Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure (4,300 meters): modulating effects of caloric restriction. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 2006; 290:E1078–E1088.
86. Braun B, Rock PB, Zamudio S, Wolfel GE, Mazzeo RS, Muza SR, et al. Women at altitude: short-term exposure to hypoxia and/or alpha(1)-adrenergic blockade reduces insulin sensitivity. *J ApplPhysiol* 2001; 91:623–631.
87. Oltmanns KM, Gehring H, Rudolf S, Schultes B, Rook S, Schweiger U, et al. Hypoxia causes glucose intolerance in humans. *Am J RespirCrit Care Med* 2004; 169:1231–1237
88. Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, et al. Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol* 2006; 577:705–716.
89. Fletcher EC. Sympathetic over activity in the etiology of hypertension of obstructive sleep apnea. *Sleep* 2003; 26: 15–19.
90. Yokoe T, Alonso LC, Romano LC, Rosa TC, O'Doherty RM, Garcia-Ocana A, et al. Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice. *J Physiol* 2008; 586: 899–911.
91. Xu J, Long YS, Gozal D, Epstein PN. Beta-cell death and proliferation after intermittent hypoxia: role of oxidative stress. *Free RadicBiol Med.* 2009; 46: 783–790.
92. Polotsky VY, Rubin AE, Balbir A, Dean T, Smith PL, Schwartz AR, et al. Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse. *Sleep Med* 2006; 7: 7–16.
93. Louis M, Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J ApplPhysiol* 2009; 106(5): 1538–1544.
94. Deibert DC, DeFronzo RA. Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest* 1980; 65: 717–721
95. Lembo G, Capaldo B, Rendina V, Iaccarino G, Napoli R, Guida R, Trimarco B, Sacca L. Acute noradrenergic activation induces insulin resistance in human skeletal muscle. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 1994;266: E242–E247.
96. Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell CP. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J RespirCrit Care Med* 2007; 175: 851–857
97. Coste O, Beers PV, Bogdan A, Charbuy H, Touitou Y. Hypoxic alterations of cortisol circadian rhythm in man after simulation of a long duration flight. *Steroids* 2005; 70: 803–810.
98. Humpeler E, Skrabal F, Bartsch G. Influence of exposure to moderate altitude on the plasma concentration of cortisol, aldosterone, renin, testosterone, and gonadotropins. *Eur J ApplPhysiolOccupPhysiol* 1980; 45: 167–176.
99. Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *ClinSci (Lond)* 1999; 96: 513–523
100. Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest* 1997; 99: 414–423
101. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005;7: 1553–1567

102. Robertson RP. Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 615–619
103. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, Hoogeveen R, Folsom AR, Heiss G. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2003; 52: 1799–1805,
104. Moller DE Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 212–217.
105. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327–334
106. Shin C, Kim J, Kim J, et al. Association of habitual snoring with glucose and insulin metabolism in nonobese Korean adult men. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 287-291.
107. Saini J Krieger J, Brandenberger G et al. Continuous positive airway pressure treatment. Effects on growth Hormone, insulin and glucose profiles in obstructive sleep apnea patients. *Horm Metab Res* 1993 25: 375-381.
108. Czupryniak L, Loba J, Pawlowski M, et al. Treatment with continuous positive airway pressure may affect blood glucose levels in nondiabetic patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 2005; 28: 601-603
109. Brooks B, Cistulli PA, Borkman M et al. Obstructive sleep apnea in obese noninsulin-dependent diabetic patients: effect of continuous positive airway pressure treatment on insulin resistance. *Journal of Clin Endocrinol and Metabol* 1994; 79: 1681-1685.
110. Babu A, Herdegen J Fogelfeld L et al. Type 2 diabetes, glycemic control and continuous positive airway pressure in obstructive sleep apnea. *Arch Intern Med*. 2005; 165: 447-452.
111. Saarialainen S, Lahtela J, Kallonen E. effect of nasal CPAP treatment on insulin sensitivity and plasma leptin. *J sleep Res* 1997; 6: 147-148.
112. Harsch IA, Schahin SP, Radespiel-Troger M et al. continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 156–162.
113. Coughlin SR, Mawdsley JA, Mugarza JA et al. Cardiovascular and metabolic effects of CPAP in obese males with OSA. *Eur Respir J* 2007; 29: 720–727.
114. Chirinos JA, Gurubhagavatula I, Teff K, Rader DJ, Wadden TA, Townsend R, Foster GD, Maislin G, Saif H, Broderick P, Chittams J, Hanlon AL, Pack AI. CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2014; 370:2265-75.
115. Guo Y, Pan L, Ren D, Xie X. Impact of continuous positive airway pressure on C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath* 2013; 17:495-503.
116. Iftikhar I, Khan M, Das A, Magalang U. Meta-analysis: continuous positive airway pressure improves insulin resistance in patients with sleep apnea without diabetes. *Ann Am Thorac Soc* 2013; 10:115-120.
117. Nadeem R, Singh M, Nida M, Waheed I, Khan A, Ahmed S, Naseem J, Champeau D. Effect of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on lipid profile: a meta-regression analysis. *J Clin Sleep Med* 2014; 10:475-489.
118. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55:434–8.

119. Alba LM, Lindor K: Review article: non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17, 977-986.
120. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001;21:17
121. Loguercio C, De Simone T, D'Auria MV, de S, I, Federico A, Tuccillo C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentreclinical study by the Italian Association for the Study of the Liver. *Dig Liver Dis* 2004;36:398-405.
122. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
123. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation* 1993;55:807-13.
124. Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am* 1996;80:1147-66.
125. Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990;85:1349-55.
126. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH: Nonalcoholic Steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37, 1202-1219.
127. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 1649-1657.
128. Loguercio C, De Girolamo V, De Sio I, Tuccillo C, Ascione A, Baldi F, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol* 2001;35:568-74.
129. Fan JG, Zhu J, Li XJ et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *J Hepatol*. 2005; 43:508-514.
130. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005;366:1197-209.
131. Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci* 2005;50:171-80
132. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000; 132:112-117.
133. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of non alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001; 121:91-100.
134. Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its associations with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med*. 2005; 22:1141-1145.
135. Angulo P: Non-alcoholic fatty liver disease, *NEJM* 2002; vol. 346: 1221-1231.

136. Kojima, Watanabe N, Numata M et al. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol.* 2003; 38: 954-961.
137. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G: Prevalence of Non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1212-1218.
138. Ahmed MH, Byrne CD. Metabolic syndrome, diabetes & CHD risk. In: Packard CJ, editor. *The Year in Lipid Disorders.* Oxford, UK: Clinical Publishing, 2007: 3-26.
139. Day CP, James OFW: Steatohepatitis: a tale of two "hits". *Gastroenterology* 1998; 114, 842-845.
140. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ.* 2005;172(7):899-905.
141. Wei Y, Rector RS, Thyfault PJ, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008; 14(2): 193-199
142. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK et al: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001. 120, 1183-1192.
143. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa RE, Pratley PA Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001. 86, 1930-1935.
144. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest J Clin Invest.* 2003;112(1):91-100.
145. Musso, G, Gambino, R, Durazzo, M, et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42:1175
146. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology.* 2004;40(1):46-54.
147. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005;54(1):117-21.
148. Auwerx J, Staels B: Leptin. *Lancet* 351, 737-142, 1998.
149. Klein S, Coppack SW, Mohamed-ali V et al: Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45, 984-987, 1996.
150. Tritos N, Mantzoros CS. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia* 40, 1371-1379, 1997.
151. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML et al: Serum immunoreactive- leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334, 292-295, 1996

152. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-546, 1995.
153. Flier JS, Maratos-Flier E: Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92, 437-440, 1998.
154. Schwartz MW, Seeley RJ: Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med* 336, 1803-1811, 1997.
155. Caro JH, Sinha MK, Kolaczynski JW et al: Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45, 1455-1462, 1996.
156. LinksNagao K, Inoue N, Ujino Y, Higa K, Shirouchi B, Wang YM, Yanagita T. Effect of leptin infusion on insulin sensitivity and lipid metabolism in diet-induced lipodystrophy model mice. *Lipids Health Dis.* 2008. 18;7(1):8.
157. Uygun A, Kadayifei A, Yesiloua Z, Erdil A, Yaman H, Saka M Deveci MS, Bagci S, Gulsen M, Karaeren N, Dagalp K. Serum leptin levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95, 3584- 3588.
158. Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, et al. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J.* 2007;21(1):53-60.
159. Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, et al. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2005;33(2):151-4.
160. Annuzzi G, Giacco R, Patti L, Bozzetto L, Viscovo D, Rivellese AA. Low plasma leptin levels in well controlled type 2 diabetes are not related to body fat mass and whole-body insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18(7):e35-6.
161. Cho YK, Lee WY, Oh SY, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Kim SW, Oh KW, Yun EJ, Oh ES. Factors affecting the serum levels of adipokines in Korean male patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology.*2007;54(77):1512-6.
162. Aller R, de Luis DA, Fernandez L, Calle F, Velayos B, Olcoz JL, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Gonzalez JM. Influence of insulin resistance and adipokines in the grade of steatosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2008;53(4):1088-92.
163. Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg.*2006;16(9):1118-25.
164. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* 2004;114(2):232-9.
165. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol.* 2005;174(9):5789-95.
166. Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G et al. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):1081-6.

167. Harrison S, Diehl A.M: Fat and liver, a molecular overview. *Seminars in gastrointestinal disease*. 2002; 3-16.
168. Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating non-alcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1018-22.
169. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fischer RA, Luketic Va et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT value. *Hepatology* 2003; 37:1286-92.
170. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;123(3):745-50.
171. Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol*.2003;15(5):539-43.
172. Grant A, Neuberger J. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice. *British Society of Gastroenterology*. *Gut*. 1999;45 Suppl 4:IV1-IV11.
173. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41; 1313–1321.
174. Adams L.A., Angulo P: Role of liver biopsy and serum makers of liver fibrosis in non alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2007; 25-35.
175. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. . Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol*.2008; 14: 185-192.
176. Khashab M, Chalasani N. Use of insulin sensitizers in NASH. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007 Dec;36(4):1067-87.
177. Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, David E, Rizzetto M, Marchesini G. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100(5):1082-90.
178. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006. 30;355(22):2297-307.
179. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2002; 34(3):255-62.
180. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Ann Epidemiol*. 2007; 17:863-869.
181. Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*. 2007 ;45(4):1007-13.
182. Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Oct;293(4):G871-7

183. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO et al. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1151-8.
184. Cuhadaroglu C, Utkusavas A, Oztürk L et al. Effects of nasal CPAP treatment on insulin Resistance, lipid profile, and plasma leptin in sleep apnea. *Lung* 2009; 187(2): 75-81.
185. Daltro C, Araújo L, Cotrim HP. Obstructive sleep apnoea and nonalcoholic fatty liver disease: risk factor or just coincidence? *Liver Int.* 2008; 28(8): 1047-9.
186. Chin K, Nakamura T, Takahashi K, Sumi K, Ogawa Y, Masuzaki H, Muro S, Hattori N, Matsumoto H, Niimi A, Chiba T, Nakao K, Mishima M, Ohi M, Nakamura T. Effects of obstructive sleep apnea syndrome on serum aminotransferase levels in obese patients. *Am J Med* 2003; 114: 370-376.
187. Tatsumi K, Saibara T. Effects of obstructive sleep apnea syndrome on hepatic steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005; 33: 100-104.
188. Tanne F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E. Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology* 2005; 41: 1290-1296.
189. Singh H, Pollock R, Uhanova J, Kryger M, Hawkins K, Minuk GY. Symptoms of obstructive sleep apnea in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2005 ;50(12):2338-43.
190. Qi-Chang Lin & Li-Da Chen & Gong-Ping Chen & Jian-Ming Zhao & Xiao Chen & Jie-Feng Huang & Li-Hua Wu. Association between nocturnal hypoxia and liver injury in the setting of nonalcoholic fatty liver disease. *Sleep Breath* DOI 10.1007/s11325-014-1008-7
191. Sundaram SS, Sokol RJ, Capocelli KE, Pan Z, Sullivan JS, Robbins K, Halbower AC (2013) Obstructive sleep apnea and hypoxemia are associated with advanced liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr.* doi:10.1016/j.jpeds.2013.10.072
192. Aron-Wisnewsky J, Minville C, Tordjman J, Levy P, Bouillot JL, Basdevant A, Bedossa P, Clement K, Pepin JL (2012) Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. *J Hepatol* 56:225–233
193. Polotsky VY, Patil SP, Savransky V, Laffan A, Fonti S, Frame LA, Steele KE, Schweitzer MA, Clark JM, Torbenson MS, Schwartz AR. Obstructive sleep apnea, insulin resistance, and steatohepatitis in severe obesity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(3):228-34.
194. Minville C, Hilleret MN, Tamisier R, Aron-Wisnewsky J, Clement K, Trocme C, Borel JC, Levy P, Zarski JP, Pepin JL (2013) Nonalcoholic fatty liver disease, nocturnal hypoxia and endothelial function in sleep apnea patients. *Chest.* doi:10.1378/chest.13-0938
195. Kohler Justin C.T. Pepperell Robert J.O. Davies John R. Stradling. Continuous Positive Airway Pressure and Liver Enzymes in Obstructive Sleep Apnoea: Data from a Randomized Controlled Trial. *Respiration* 2009; 78:141–146.
196. Leila Kheirandish-Gozal, MD; Oscar Sans Capdevila, MD; Ebrahim Kheirandish, MD; and David Gozal, MD, FCCP. Elevated Serum Aminotransferase Levels in Children at Risk for Obstructive Sleep Apnea. *Chest* 2008; 133:92–99.

197. Carla Daltro, Helma P. Cotrim, Erivaldo Alves, Luiz Antônio de Freitas, Leila Araújo, Leonardo Boente, Rafael Leal, Thaís Portugal. Nonalcoholic fatty liver disease associated with obstructive sleep apnea: just a coincidence? *Obes Surg* 2010; 20(11):1536-43.
198. Jouet P, Sabate JM, Maillard D, Msika S, Mechler C, Ledoux S, Harnois F, Coffin B. Relationship between obstructive sleep apnea and liver abnormalities in morbidly obese patients: a prospective study. *Obes Surg* 2007; 17: 478-485.
199. Kallwitz ER, Herdegen J, Madura J, Jakate S, Cotler SJ. Liver enzymes and histology in obese patients with obstructive sleepapnea. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 918-921.
200. Mishra P, Nugent C, Afendy A, Bai C, Bhatia P, Afendy M, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Younossi ZM. Apnoeic-hypopnoeic episodes during obstructive sleep apnoea are associated with histological nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2008; 28: 1080-1086.
201. Brunt E, Kleiner DE, Wilson LA et al. Portal Chronic Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Histologic Marker of Advanced NAFLD Clinicopathologic Correlations from the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. *Hepatology* 2009; 49: 809-20.
202. Feng SZ, Tian JL, Zhang Q, Wang H, Sun N, Zhang Y, Chen BY. An experimental research on chronic intermittent hypoxia leading to liver injury. *Sleep Breath*. 2010.
203. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 2003; 552: 253–264.
204. Li J, Thorne LN, Punjabi NM et al. Intermittent hipoxia induced hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res*. 2005; 97: 698-706.
205. Norman D, Bardwell WA, Arosemena F, Nelesen R, Mills PJ, Loredo JS, Lavine JE, Dimsdale JE. Serum aminotransferase levels are associated with markers of hypoxia in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 2008; 31: 121-126
206. Kanbay A, Kaya E, Buyukoglan H, Ozdogan N, Kaya MG, Oymak FS, Gulmez I, Demir R, Kokturk O. Serum gamma-glutamyl transferase activity is an independent predictor for cardiovascular disease in obstructive sleep apnea syndrome. *Respir Med*. 2011 Apr;105(4):637-42.
207. Punjabi NM, Sorkin JD, Katznel LI et al. Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men. *Am J Resp Crit Care med* 2002; 165: 677-682.
208. Ip MS, Lam B, Ng MM et al. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 670–676.
209. Yoneda M et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Liver Dis*. 2008 May;40(5):371-8.
210. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med*. 2011; 43:617-649.

211. Coughlin S, Calverley P, Wilding J. Sleep disordered breathing--a new component of syndrome x? *Obes Rev.* 2001; 2: 267-274
212. Vgontzas AN, Bixler EO, Chrousos GP. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Med Rev* 2005;9:211-224
213. Shpirer I, Copel L, Broide E, Elizur A. Continuous positive airway pressure improves sleep apnea associated fatty liver. *Lung* 2010; 188: 301-7
214. Castéra L, Foucher J, Bernard PH, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology* 2010; 51:828-835
215. Dyson JK, McPherson S, Anstee QM. Non-alcoholic fatty liver disease: non-invasive investigation and risk stratification. *J ClinPathol* 2013; 66: 1033-45
216. Nobili V, Cutrera R, Liccardo D, Pavone M, Devito R, Giorgio V et al. Obstructive sleep apnea syndrome affects liver histology and inflammatory cell activation in pediatric nonalcoholic fatty liver disease, regardless of obesity/insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189:66-76
217. Gunnarsson SI, Peppard PE, Korcarz CE, Barnett JH, Aeschlimann SE, Hagen EW, Young T, Hla KM, Stein JH. Obstructive sleep apnea is associated with future subclinical carotid artery disease: thirteen years follow up from the Wisconsin sleep cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 2338-42