



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI MEDICINA – DIMED

U.O.C. CLINICA MEDICA 1

Direttore: Prof. Paolo Simioni

TESI DI LAUREA

**MASLD e rischio cardiovascolare: impatto della severità
della fibrosi epatica sulle alterazioni emostatiche e sul
danno vascolare subclinico**

Relatore: Prof. Paolo Simioni

Laureando: Alberto Frasson

Correlatore: Prof.ssa Elena Campello

Anno Accademico 2025-2026

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUZIONE	5
1.1 MASLD: definizione e storia.....	5
1.1.1 Evoluzione della nomenclatura	5
1.1.2 Classificazione della steatotic liver disease e diagnosi differenziale	6
1.1.3 Criteri diagnostici attuali	7
1.1.4 Concordanza tra NAFLD e MASLD.....	7
1.2 Epidemiologia.....	8
1.2.1 Prevalenza, incidenza e distribuzione.....	8
1.2.2 Associazione con i principali fattori di rischio.....	8
1.3 Fisiopatologia e storia naturale	9
1.3.1 Spettro della malattia ed eterogeneità evolutiva.....	9
1.3.2 Dai fattori di rischio alla steatosi.....	9
1.3.3 Dalla steatosi alla MASH.....	10
1.3.4 Dalla MASH alla fibrosi.....	11
1.4 Valutazione della fibrosi	13
1.4.1 Stadiazione biptica.....	13
1.4.2 Valutazione non invasiva.....	14
1.4.3 Fibrosi e prognosi epatica.....	15
1.5 MASLD e rischio cardiovascolare.....	17
1.5.1 Epidemiologia e rilevanza clinica	17
1.5.2 Principali manifestazioni cardiovascolari.....	18
1.5.3 Patogenesi delle manifestazioni cardiovascolari	20
1.5.4 Relazione con la severità della fibrosi epatica	23
1.6 MASLD e alterazioni emostatiche.....	25
1.6.1 Il concetto di emostasi ribilanciata nelle epatopatie croniche.....	25
1.6.2 Alterazioni emostatiche nella MASLD	27
1.7 MASLD e danno vascolare subclinico	31
1.7.1 Danno carotideo: spessore intima-media e placche.....	31
1.7.2 Arteriopatia periferica	32
1.7.3 Aorta addominale: diametro e dilatazione aneurismatica	33
1.7.4 Associazione con la gravità della fibrosi epatica	33
2 SCOPO DELLO STUDIO.....	35
3 MATERIALI E METODI	37
3.1 Popolazione dello studio e criteri di selezione.....	37
3.2 Raccolta dei dati clinici e laboratoristici.....	37
3.3 Valutazione della fibrosi epatica	38
3.4 Valutazione emostatica, vascolare e infiammatoria	38
3.4.1 Valutazione dell'emostasi.....	38

3.4.2	Valutazione del danno vascolare subclinico	39
3.4.3	Valutazione dell'inflammation sistemica	40
3.5	Analisi statistica	40
4	RISULTATI	41
4.1	Caratteristiche della popolazione generale.....	41
4.1.1	Profilo epatico e grado di fibrosi	43
4.1.2	Profilo ematologico, metabolico ed emostatico.....	44
4.2	Confronto tra pazienti con fibrosi F0–F2 e fibrosi avanzata F3–F4	46
4.2.1	Valutazione dell'emostasi	47
4.2.2	Outcome vascolari secondo la gravità della fibrosi	52
4.3	Analisi di associazione tra severità della fibrosi e profilo emostatico	53
4.3.1	Associazione tra stiffness epatica e parametri emostatici.....	53
4.3.2	Relazione tra risposta alla TM e anticoagulanti naturali	54
4.3.3	Associazione indipendente tra parametri emostatici e fibrosi avanzata	56
5	DISCUSSIONE	59
5.1	Profilo clinico, metabolico e infiammatorio	59
5.2	Alterazioni del profilo emostatico.....	59
5.2.1	Anticoagulanti naturali e fattori procoagulanti.....	59
5.2.2	Generazione di trombina e risposta alla trombomodulina.....	61
5.2.3	Piastrine e ROTEM.....	62
5.3	Danno vascolare subclinico.....	64
5.4	Implicazioni dello studio	65
5.5	Limiti dello studio	65
6	CONCLUSIONI.....	67
	BIBLIOGRAFIA	69

RIASSUNTO

Introduzione: La metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) è una malattia altamente prevalente, associata a un aumento della morbilità e della mortalità cardiovascolare. La fibrosi epatica è un importante determinante prognostico, ma il suo ruolo nelle alterazioni emostatiche, nel danno vascolare subclinico e nell'infiammazione sistemica non è ancora completamente definito.

Scopo: L'obiettivo principale era valutare, in una coorte di pazienti con MASLD, l'associazione tra fibrosi avanzata e alterazioni dell'emostasi. Gli obiettivi secondari comprendevano la valutazione del danno vascolare subclinico e dei marcatori di infiammazione sistemica.

Metodi: Sono stati inclusi consecutivamente 616 pazienti con MASLD, stratificati mediante elastografia transiente in base alla severità della fibrosi. Sono stati quindi confrontati due gruppi: fibrosi non avanzata (F0–F2) e fibrosi avanzata (F3–F4). Sono stati analizzati parametri emostatici, tromboelastometria rotazionale (rotational thromboelastometry, ROTEM), generazione di trombina con e senza trombomodulina e marcatori infiammatori. Il danno vascolare è stato valutato mediante ecocolor-Doppler considerando spessore intima-media carotideo, placche carotidee e degli arti inferiori, indice caviglia-braccio (ankle-brachial index, ABI) e diametro dell'aorta addominale. Le associazioni emostatiche sono state valutate anche mediante regressione logistica multivariata aggiustata per età, sesso, indice di massa corporea (BMI) e diabete.

Risultati: La fibrosi era classificabile in 587 pazienti: 538 erano F0–F2 e 49 F3–F4. Rispetto ai pazienti F0–F2, quelli con fibrosi avanzata presentavano una conta piastrinica inferiore ($160,5$ vs $182 \times 10^9/L$; $p < 0,001$), livelli inferiori di antigene della proteina C (106% vs $118,5\%$; $p = 0,004$) e di antitrombina ($92,5\%$ vs 103% ; $p < 0,001$) e livelli superiori di fattore VIII ($157,5\%$ vs 139% ; $p = 0,004$) e di fibrinogeno (388 vs 360 mg/dL; $p = 0,023$). Con trombomodulina, i pazienti F3–F4 presentavano un potenziale endogeno di trombina (ETP) maggiore ($952,0$ vs $769,9$ nM·min; $p = 0,002$). La risposta anticoagulante alla trombomodulina era ridotta, con minore ETP inhibition, espressione della percentuale di inibizione dell'ETP ($31,5\%$

vs 39,3%; $p=0,003$), e maggiore ETP ratio, corrispondente al rapporto tra ETP con e senza trombomodulina (0,69 vs 0,61; $p=0,003$). Nell'analisi complessiva, i parametri di tromboelastometria e l'aggregazione piastrinica non differivano tra i gruppi. Dopo aggiustamento per età, sesso, indice di massa corporea e diabete mellito, restavano significative le associazioni tra fibrosi avanzata e FVIII, antigene della proteina C, antitrombina e parametri di generazione della trombina in presenza di trombomodulina. La placca carotidea sinistra era più frequente nei pazienti F3–F4 (43,5% vs 28,1%; $p=0,041$); gli altri parametri vascolari non differivano significativamente. La proteina C-reattiva ad alta sensibilità non differiva tra i gruppi ($p=0,091$).

Conclusioni: La fibrosi avanzata nella MASLD si associa a un profilo emostatico ribilanciato e potenzialmente protrombotico, caratterizzato dalla riduzione degli anticoagulanti naturali, dall'aumento dei fattori procoagulanti e da una ridotta risposta alla trombomodulina. L'associazione vascolare è risultata limitata e potrebbe riflettere il maggiore carico di fattori di rischio cardiometabolici concomitanti.

ABSTRACT

Introduction: Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is highly prevalent and associated with increased cardiovascular morbidity and mortality. Liver fibrosis is an important prognostic determinant, but its role in hemostatic alterations, subclinical vascular damage and systemic inflammation has not yet been fully defined.

Aim: The primary aim was to assess, in a cohort of patients with MASLD, the association between advanced fibrosis and hemostatic alterations. Secondary objectives included the assessment of subclinical vascular damage and markers of systemic inflammation.

Methods: A total of 616 patients with MASLD were consecutively included and stratified according to fibrosis severity by transient elastography. Two groups were compared: non-advanced fibrosis (F0–F2) and advanced fibrosis (F3–F4). Hemostatic parameters, rotational thromboelastometry (ROTEM), thrombin generation with and without thrombomodulin, and inflammatory markers were analyzed. Vascular damage was assessed by color-Doppler ultrasound, considering carotid intima-media thickness, carotid and lower-limb plaques, the ankle-brachial index (ABI), and abdominal aortic diameter. Hemostatic associations were also assessed using multivariable logistic regression adjusted for age, sex, body mass index (BMI) and diabetes.

Results: Fibrosis could be classified in 587 patients: 538 had F0–F2 fibrosis and 49 had F3–F4 fibrosis. Compared with patients with F0–F2 fibrosis, those with advanced fibrosis had a lower platelet count (160.5 vs $182 \times 10^9/L$; $p < 0.001$), lower protein C antigen levels (106% vs 118.5% ; $p = 0.004$) and antithrombin levels (92.5% vs 103% ; $p < 0.001$), and higher factor VIII (157.5% vs 139% ; $p = 0.004$) and fibrinogen levels (388 vs 360 mg/dL; $p = 0.023$). In the presence of thrombomodulin, patients with F3–F4 fibrosis showed higher endogenous thrombin potential (ETP) (952.0 vs 769.9 nM·min; $p = 0.002$). The anticoagulant response to thrombomodulin was reduced, with lower ETP inhibition, expressed as the percentage inhibition of ETP (31.5% vs 39.3% ; $p = 0.003$), and a higher ETP ratio, corresponding to the ratio between ETP with and without thrombomodulin (0.69 vs 0.61 ; $p = 0.003$). In the

overall analysis, thromboelastometry parameters and platelet aggregation did not differ between the groups. After adjustment for age, sex, body mass index and diabetes mellitus, the associations between advanced fibrosis and factor VIII, protein C antigen, antithrombin, and thrombin generation parameters in the presence of thrombomodulin remained significant. Left carotid plaque was more frequent in patients with F3–F4 fibrosis (43.5% vs 28.1%; $p=0.041$), whereas the other vascular parameters did not differ significantly. High-sensitivity C-reactive protein did not differ between the groups ($p=0.091$).

Conclusions: Advanced fibrosis in MASLD is associated with a rebalanced and potentially prothrombotic hemostatic profile, characterized by reduced levels of natural anticoagulants, increased levels of procoagulant factors, and a reduced response to thrombomodulin. The vascular association was limited and may reflect the greater burden of concomitant cardiometabolic risk factors.

1 INTRODUZIONE

1.1 MASLD: definizione e storia

La metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) è una malattia epatica cronica ad alta prevalenza, associata alla presenza di fattori di rischio cardiometabolico. Il suo spettro comprende la steatosi isolata, la steatoepatite metabolica (MASH), la fibrosi progressiva e infine la cirrosi. Oltre alle complicanze legate al fegato, questa patologia è associata a eventi cardiovascolari e ad altre complicanze extraepatiche (1,2).

1.1.1 Evoluzione della nomenclatura

La storia della nomenclatura di questa patologia comincia nel 1980, quando Jürgen Ludwig introdusse il termine non-alcoholic steatohepatitis (NASH) per descrivere un danno epatico caratterizzato da steatosi, infiammazione e ballooning epatocitario, osservato in soggetti spesso obesi e con alterazioni metaboliche (3,4). Negli anni successivi venne introdotto il termine più ampio di non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), che comprendeva la steatosi e la steatoepatite (3,4). Questa denominazione ha rappresentato per decenni il riferimento per la pratica clinica e la ricerca, ma presentava diversi limiti: definiva la malattia per esclusione, non rappresentava adeguatamente la componente metabolica e rendeva difficile classificare la coesistenza di altri fattori eziologici (2,3). Inoltre, il termine “fatty” era considerato potenzialmente stigmatizzante (3).

Nel 2020 fu proposta la denominazione metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD), basata sul riconoscimento della disfunzione metabolica e applicabile anche in presenza di consumo alcolico o di altre cause di epatopatia (5). Questa denominazione non ottenne un consenso condiviso, in quanto manteneva il termine “fatty” e non distingueva chiaramente il contributo delle eziologie concomitanti, in particolare dell'alcol (2,3).

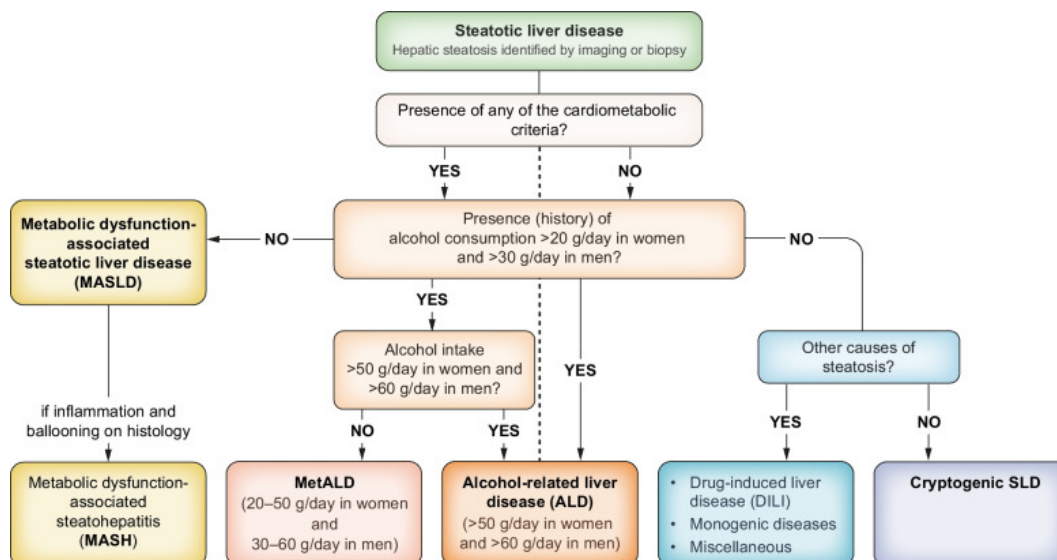
Nel 2023, un processo Delphi multisocietario, al quale parteciparono 236 esperti provenienti da 56 Paesi, definì una nuova nomenclatura condivisa: steatotic liver disease (SLD) fu adottato come termine generale, mentre le denominazioni NAFLD e NASH furono sostituite rispettivamente da metabolic dysfunction-associated

steatotic liver disease (MASLD) e metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) (3).

1.1.2 Classificazione della steatotic liver disease e diagnosi differenziale

Il consensus del 2023 distingue le SLD in base a eziologia e consumo alcolico. La MASLD comprende i pazienti con steatosi e disfunzione metabolica senza consumo significativo di alcol. La categoria MetALD identifica i pazienti che soddisfano i criteri metabolici ma consumano anche alcol in una quantità compresa tra 20-50 g/die nelle donne e 30-60 g/die negli uomini. Oltre queste soglie (>50 g/die nelle donne e >60 g/die negli uomini) si identifica la malattia epatica alcol-correlata (ALD), anche in presenza di fattori metabolici concomitanti. Vi sono poi le steatosi a eziologia definita (tra cui quelle da farmaci, da malnutrizione e le forme monogeniche) e le forme criptogeniche, nelle quali non è identificabile una causa (1,3). Nel seguente schema si può osservare l'algoritmo per la diagnosi differenziale di steatosi epatica secondo le linee guida europee (Figura 1).

Figura 1: diagnosi differenziale delle diverse forme di steatosi epatica (1)



1.1.3 Criteri diagnostici attuali

Secondo le linee guida EASL–EASD–EASO e il consenso Delphi del 2023, la diagnosi di MASLD richiede la presenza di steatosi epatica, documentata mediante imaging o biopsia, associata ad almeno uno dei cinque criteri cardiometabolici e a un consumo alcolico inferiore a 20 g/die nelle donne e 30 g/die negli uomini (1,3). I criteri cardiometabolici comprendono: (1) BMI ≥ 25 kg/m² oppure circonferenza vita >94 cm negli uomini e >80 cm nelle donne, con soglie variabili in base all'etnia; (2) glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dL, glicemia a due ore dall'OGTT ≥ 140 mg/dL, HbA1c $\geq 5,7\%$, diabete mellito di tipo 2 o trattamento antidiabetico; (3) pressione arteriosa $\geq 130/85$ mmHg o terapia antipertensiva; (4) trigliceridi ≥ 150 mg/dL o terapia ipolipemizzante; (5) colesterolo HDL ≤ 40 mg/dL negli uomini e ≤ 50 mg/dL nelle donne o terapia ipolipemizzante (1,3).

1.1.4 Concordanza tra NAFLD e MASLD

L'introduzione del nuovo termine ha reso necessario verificare se le nuove popolazioni classificate secondo i nuovi criteri di MASLD corrispondessero a quelle precedentemente classificate come NAFLD (4,6). L'analisi della coorte TARGET-NASH su 5.745 pazienti ha documentato una concordanza complessiva del 99% tra le due definizioni (6). Da una coorte asiatica è emerso che il 97,7% dei soggetti della popolazione comunitaria e il 99,8% dei 414 pazienti ospedalieri con NAFLD istologica soddisfacevano i requisiti metabolici (7). Nel contesto europeo, la valutazione di un registro di 2.187 pazienti ha mostrato una sovrapposizione del 98-99% (8). Nel complesso quindi, questi studi documentano una sovrapposizione quasi completa tra le due diverse popolazioni (6–8) e ciò supporta l'applicabilità alla MASLD di gran parte delle evidenze prodotte utilizzando la precedente definizione, pur tenendo conto delle differenze introdotte dai nuovi criteri (4,6,7).

Nei capitoli successivi verrà utilizzato il termine generale MASLD. Per i singoli studi saranno invece mantenuti i termini NAFLD, NASH o MAFLD utilizzati dagli autori.

1.2 Epidemiologia

1.2.1 Prevalenza, incidenza e distribuzione

La MASLD è la più diffusa epatopatia cronica nel mondo, con una prevalenza nella popolazione adulta stimata intorno al 38% (9). Nel corso degli anni si è osservato un incremento progressivo della prevalenza, passata dal 25,5% negli studi condotti fino al 2005 al 37,8% in quelli riferiti al 2016 o agli anni successivi (10). Si stima che entro il 2040 la prevalenza negli adulti possa superare il 55% (9). L'incidenza è stata stimata in 46,9 casi per 1.000 persone-anno, sebbene gli studi inclusi in questa analisi provenissero esclusivamente da paesi asiatici (10). La distribuzione geografica e demografica non è uniforme: la prevalenza stimata è maggiore in America Latina e minore in Europa occidentale, con valori rispettivamente del 44,4% e del 25,1% (9). Sono documentate inoltre differenze legate al sesso: rispetto alle donne, gli uomini presentano una maggiore prevalenza (39,7% contro 25,6%) e una maggiore incidenza (70,8 contro 29,6 nuovi casi per 1.000 persone-anno) (10).

1.2.2 Associazione con i principali fattori di rischio

I disturbi metabolici rappresentano le principali condizioni associate alla MASLD e l'insulino-resistenza costituisce un importante elemento fisiopatologico comune (9). Nei soggetti con sovrappeso e obesità, la prevalenza della MASLD raggiunge rispettivamente il 69,99% e il 75,27%, mentre quella della MASH si attesta intorno al 33% in entrambi i gruppi (11). In questa classe di pazienti, la fibrosi clinicamente significativa interessa circa il 20% dei casi e quella avanzata quasi il 7% (11). Inoltre, nei casi in cui la MASH è confermata istologicamente, le prevalenze della fibrosi significativa e di quella avanzata salgono rispettivamente al 35,14% e al 19,35% (11). Anche il diabete mellito tipo 2 identifica una popolazione ad alta prevalenza di MASLD, stimata complessivamente al 65,33% e fino a circa il 70% nei pazienti che presentano anche altri fattori di rischio cardiometabolico (12). Nelle coorti di pazienti con diabete e MASLD sottoposti a biopsia, le prevalenze di MASH, fibrosi significativa e fibrosi avanzata sono rispettivamente del 66,44%, 40,78% e 15,49% (12). Nei soggetti con sindrome metabolica, infine, la prevalenza della MASLD è stimata intorno al 73% (9).

1.3 Fisiopatologia e storia naturale

1.3.1 Spettro della malattia ed eterogeneità evolutiva

La MASLD presenta un decorso eterogeneo, che può essere schematicamente rappresentato come una progressione dalla steatosi alla MASH e alla fibrosi, fino alla cirrosi. Questa sequenza non è obbligata: nel tempo la malattia può rimanere stabile, progredire con velocità variabile oppure regredire, anche in relazione alle modificazioni del contesto cardiometabolico (2,13). Il decorso è influenzato dal peso corporeo, dall'insulino-resistenza e dal diabete, dal consumo di alcol e dalla suscettibilità genetica (13). In alcune coorti, la progressione verso la cirrosi si osservava nel 3-5% dei soggetti, solitamente dopo decenni di malattia (13). Negli stadi non cirrotici, la mortalità è dovuta prevalentemente a cause extraepatiche, in particolare cardiovascolari e oncologiche (13).

1.3.2 Dai fattori di rischio alla steatosi

L'insorgenza della steatosi epatica nella MASLD riflette uno squilibrio del metabolismo energetico sistemico, nel quale l'insulino-resistenza svolge un ruolo centrale (14,15). L'accumulo di trigliceridi negli epatociti deriva principalmente da tre fonti: l'afflusso di acidi grassi liberi provenienti dal tessuto adiposo, la lipogenesi de novo epatica e l'apporto diretto di lipidi alimentari (15). L'insulino-resistenza favorisce soprattutto i primi due meccanismi, attraverso i suoi effetti sul tessuto adiposo, sul muscolo scheletrico e sul fegato.

In condizioni di surplus energetico, il tessuto adiposo diventa insulino-resistente e meno sensibile all'azione anti-lipolitica dell'insulina (14,15). Ne consegue un aumento della lipolisi, mediata da enzimi lipasi, con rilascio in circolo di acidi grassi liberi e incremento del loro afflusso al fegato (15). In uno studio condotto con traccianti isotopici, gli acidi grassi non esterificati circolanti costituivano circa il 59% degli acidi grassi presenti nei trigliceridi epatici (16). Secondo lo stesso studio, al 26% contribuiva la lipogenesi de novo epatica (16), un processo di sintesi lipidica che avviene nel fegato, in questo caso stimolato dall'insulino-resistenza a livello muscolare ed epatico (14,17). Nel muscolo scheletrico insulino-resistente, vi è una riduzione della captazione del glucosio e quindi della sua deposizione sotto forma di glicogeno, determinando un maggiore afflusso post-prandiale di glucosio al fegato, il quale viene utilizzato per la sintesi di acidi grassi (14,17). A livello

epatico, l'alterata risposta insulinica riduce la sintesi di glicogeno, mentre l'iperinsulinemia compensatoria continua a sostenere le vie lipogeniche (14,17). Una quota ulteriore, stimata dallo studio con i traccianti intorno al 15%, era costituita da acidi grassi di origine alimentare (16). La suscettibilità individuale è inoltre modulata da varianti di geni quali PNPLA3, TM6SF2 e MBOAT7, che alterano, mediante meccanismi differenti, la gestione epatica dei lipidi (13,14).

Nel complesso, l'afflusso e la sintesi di acidi grassi possono superare la capacità dell'epatocita di ossidarli o esportarli sotto forma di VLDL, determinandone l'esterificazione e l'accumulo intracellulare e quindi steatosi (14,17).

1.3.3 Dalla steatosi alla MASH

L'esterificazione degli acidi grassi in trigliceridi e il loro deposito nelle gocce lipidiche rappresentano un sistema di stoccaggio relativamente inerte, capace di limitare l'esposizione dell'epatocita a metaboliti lipidici più dannosi (14). La progressione verso la MASH dipende dall'azione tossica di specie lipidiche bioattive che si formano quando l'afflusso di substrati supera le capacità metaboliche dell'epatocita (14,15). Questi metaboliti tossici sono per esempio gli acidi grassi saturi, le ceramidi, la lisofosfatidilcolina e il colesterolo libero (15,18). L'eccessivo flusso di acidi grassi attraverso i mitocondri aumenta inizialmente la loro attività ossidativa, ma il persistere del sovraccarico favorisce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la progressiva disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo (14,15). Parallelamente, l'accumulo di lipidi altera l'omeostasi del reticolo endoplasmatico, attivando una risposta allo stress che può contribuire al danno cellulare (15,18). Una manifestazione morfologica caratteristica di questo danno è il ballooning epatocitario, una forma di lesione subletale nella quale gli epatociti appaiono rigonfi ma rimangono vitali (14). Il protrarsi dello stress può tuttavia indurre diverse forme di morte cellulare regolata (14,18). L'apoptosi è una delle forme di morte cellulare maggiormente studiate nella progressione della MASH. Possono contribuire anche la necroptosi e la piroptosi, sebbene il loro peso relativo non sia ancora chiaramente definito (14,18). Gli epatociti danneggiati possono rilasciare segnali di pericolo, mediatori proinfiammatori e vescicole extracellulari, mentre le forme litiche di morte cellulare determinano la liberazione di componenti intracellulari nel microambiente epatico (14,18). Questi segnali attivano le cellule di Kupffer residenti e favoriscono il reclutamento di monociti

circolanti, i quali assumono un fenotipo macrofagico proinfiammatorio (14,15). Il rilascio di citochine e l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 contribuiscono poi ad amplificare e mantenere l'infiammazione lobulare (14,15,18).

Il processo è ulteriormente modulato da fattori extraepatici: il tessuto adiposo disfunzionale mantiene l'afflusso di acidi grassi e mediatori proinfiammatori, mentre le alterazioni dell'asse intestino-fegato possono potenziare la risposta immunitaria epatica (15). La disbiosi e la compromissione della barriera intestinale favoriscono infatti la traslocazione portale di prodotti microbici, capaci di attivare i meccanismi dell'immunità innata (17,18).

In sintesi, l'interazione tra lipotossicità, danno epatocitario e risposta immunitaria favorisce lo sviluppo della MASH, caratterizzata istologicamente dalla presenza di steatosi, infiammazione lobulare e ballooning epatocitario (14,17). La cronicizzazione di questo quadro di danno epatocitario e infiammazione favorisce nel tempo l'attivazione dei processi che portano alla fibrosi (14).

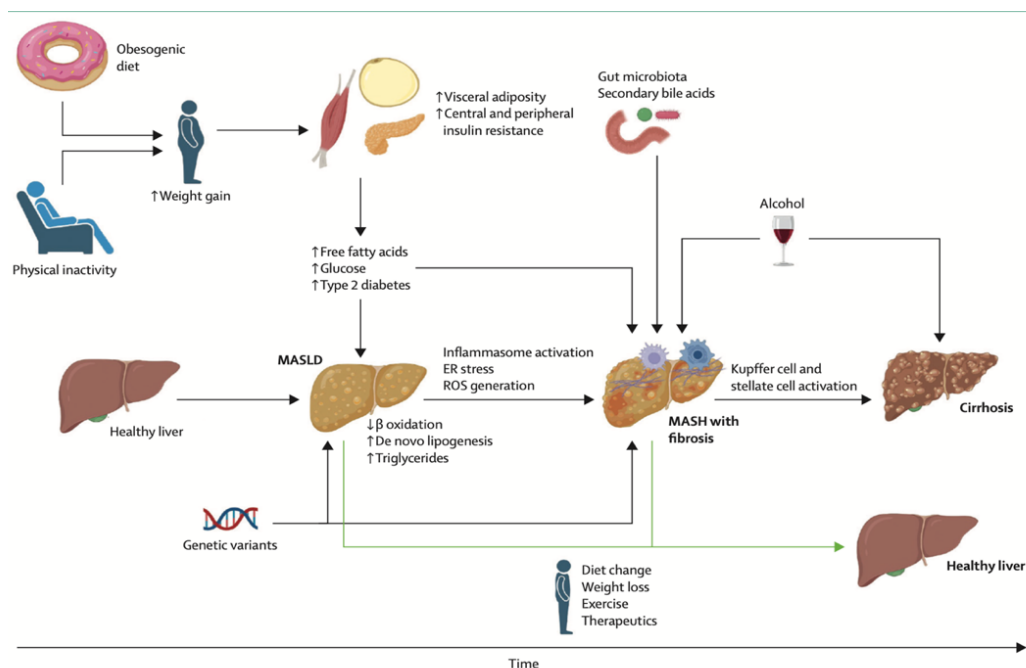
1.3.4 Dalla MASH alla fibrosi

La persistenza del danno epatocitario e dell'infiammazione trasforma una risposta inizialmente riparativa in un processo fibrogenico cronico (14,19). Gli epatociti stressati o in via di morte rilasciano DAMPs e vescicole extracellulari, che attivano le cellule di Kupffer e favoriscono il reclutamento di macrofagi derivati dai monociti circolanti, collegando il danno parenchimale all'attivazione delle cellule fibrogeniche (19).

Un ruolo centrale è svolto dalle cellule stellate epatiche (HSC), che nello stato quiescente risiedono nello spazio di Disse e immagazzinano vitamina A (14). In presenza di un danno cronico, le HSC assumono un fenotipo miofibroblastico, acquisendo capacità proliferative, migratorie e contrattili e aumentando la produzione di matrice extracellulare (ECM) (14,19). Il mantenimento di questo fenotipo dipende dalla comunicazione tra epatociti danneggiati, macrofagi e le altre cellule del microambiente epatico, che rilasciano mediatori profibrogenici (14,19). Tra questi, il TGF- β è uno dei principali responsabili dell'attivazione delle HSC e della produzione di matrice extracellulare (14,19). L'accumulo di matrice deriva sia dall'aumento della sua sintesi sia dalla sua ridotta degradazione, determinata dallo squilibrio tra metalloproteasi (MMP) e i loro inibitori tissutali (TIMP) (14). Con il progredire della fibrosi, l'accumulo di matrice altera l'architettura epatica e

contribuisce all'aumento della rigidità tissutale e delle resistenze vascolari, alle quali partecipa anche la contrattilità dei miofibroblasti. Parallelamente, l'ipossia e la produzione di mediatori proangiogenici favoriscono una neoangiogenesi che accompagna la formazione dei setti fibrosi (14). Negli stadi avanzati, il rimodellamento dell'architettura epatica culmina nella cirrosi, con ipertensione portale, formazione di shunt vascolari e progressiva insufficienza epatica (14,19). La fibrosi conserva un certo grado di reversibilità quando lo stimolo lesivo viene ridotto o rimosso, sebbene tale potenziale diminuisca con l'avanzare della malattia (14,19). La regressione comporta la riduzione dei mediatori profibrogenici, l'aumento della degradazione della matrice mediata dalle MMP e la diminuzione delle HSC attivate attraverso apoptosi, senescenza o inattivazione (14). Negli stadi avanzati però, la regressione diviene più lenta e spesso incompleta (19). È necessario specificare che le cellule inattivate presentano un profilo epigenetico distinto da quello delle HSC quiescenti originali, quindi nonostante una regressione sia possibile, possono comunque riattivarsi rapidamente in caso di una nuova lesione (14). Nell'immagine sottostante vengono riassunti i meccanismi fisiopatologici descritti (Figura 2).

Figura 2: fisiopatologia del danno epatico nella MASLD (13).



1.4 Valutazione della fibrosi

Nella MASLD, la fibrosi epatica rappresenta uno dei principali elementi di gravità ed è associata alla prognosi della malattia (1,20). Può essere valutata mediante esame istologico (20) o con metodiche non invasive, che contribuiscono a stimarne l'estensione e a stratificare il rischio dei pazienti (1).

1.4.1 Stadiazione bioptica

Nella MASLD, la biopsia epatica rappresenta il metodo di riferimento per la valutazione microscopica e la stadiazione della fibrosi (20). Quest'ultima presenta una distribuzione caratteristica, comparando inizialmente come un sottile deposito perisinusoidale e pericellulare in zona 3, che può successivamente associarsi al coinvolgimento portale, alla formazione di ponti fibrosi e alla cirrosi (20). La fibrosi viene distinta nei seguenti stadi (20):

- F0: assenza di fibrosi;
- F1: comprende i sottostadi F1a e F1b, entrambi caratterizzati da fibrosi perivenulare e perisinusoidale in zona 3 e distinti in funzione dell'entità del deposito, e il sottostadio F1c, definito dalla presenza isolata di fibrosi portale e periportale;
- F2: presenza di fibrosi perisinusoidale in zona 3 associata a fibrosi portale o periportale;
- F3: presenza di ponti fibrosi (bridging fibrosis);
- F4: corrisponde alla cirrosi (20).

Oltre allo stadio di fibrosi, l'esame istologico valuta l'attività della malattia. In presenza di steatosi, il riscontro di ballooning epatocitario e infiammazione lobulare consente di formulare la diagnosi morfologica di MASH (1,20).

Può essere rilevante anche la distinzione tra il grado di steatosi, di attività necroinfiammatoria e di deposizione fibrotica. A questo scopo, il sistema SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis) valuta separatamente steatosi, attività e fibrosi. Il sistema NAS (NAFLD Activity Score) quantifica invece la steatosi, l'infiammazione lobulare e il ballooning; il punteggio ottenuto, tuttavia, non sostituisce la diagnosi morfologica formulata dal patologo (20).

L'impiego della biopsia è limitato dall'invasività, associata a un rischio basso ma reale di morbidità e mortalità, dall'errore di campionamento dovuto alla distribuzione non uniforme delle lesioni e dalla variabilità interpretativa (20). Per questi motivi, la biopsia non è indicata per il monitoraggio routinario dell'evoluzione della malattia o della risposta terapeutica; nella pratica clinica si utilizzano prevalentemente metodiche non invasive (1).

1.4.2 Valutazione non invasiva

I test non invasivi (NIT) che valutano fibrosi epatica comprendono degli score derivati da parametri clinico-laboratoristici e metodiche di imaging che valutano prevalentemente le proprietà meccaniche del fegato (1,21). Le linee guida raccomandano un approccio sequenziale, basato su un test ematico iniziale seguito, quando indicato, da un test di secondo livello (1,21).

1.4.2.1 Test di primo livello

Il Fibrosis-4 index (FIB-4), uno dei test più consolidati, è calcolato in base a età, AST, ALT e conta piastrinica (1,21). Un valore inferiore a 1,30 identifica un basso rischio di fibrosi avanzata (nei soggetti di età superiore a 65 anni il cut-off inferiore è pari a 2,0) (1). Per i valori compresi tra 1,30 e 2,67, le linee guida europee prevedono approfondimenti mediante elastografia oppure rivalutazione dopo intervento di correzione sullo stile di vita e sui fattori di rischio cardiometabolico. Infine, per valori superiori a 2,67 è indicato l'invio dallo specialista per esami di approfondimento (1).

1.4.2.2 Test di secondo livello

Nei pazienti per i quali il risultato del FIB-4 e il contesto clinico indicano la necessità di un approfondimento, le linee guida EASL–EASD–EASO del 2024 raccomandano l'impiego di una metodica di imaging di secondo livello (1). Tra queste, la vibration-controlled transient elastography (VCTE) è la tecnica più ampiamente validata e disponibile secondo le linee guida europee sui test non invasivi (21). La VCTE rileva la rigidità epatica (liver stiffness measurement, LSM), espressa in chilopascal (kPa), consentendo una stima del grado di fibrosi (1,21).

Nell'algoritmo proposto dalle linee guida EASL–EASD–EASO del 2024, una LSM inferiore a 8 kPa viene utilizzata per il rule-out della fibrosi avanzata (si esclude con ragionevole certezza una fibrosi di stadio F3 o superiore), mentre valori pari o superiori richiedono ulteriori accertamenti (1,21). Una LSM pari o superiore a 12 kPa è indicata come soglia di rule-in per la fibrosi avanzata, definita come stadio $\geq$ F3 (1). Per quanto riguarda le altre metodiche ecografiche, la shear wave elastography (SWE) mostra prestazioni diagnostiche simili alla VCTE (1).

Tra le NIT vi è anche la risonanza elastografica (MRE), la quale è considerata la metodica non invasiva più accurata per la stadiazione della fibrosi ma presenta costi elevati e una disponibilità limitata, per questo viene riservata alla ricerca o a casi selezionati (1,21).

1.4.2.3 Limiti dei test non invasivi

Infiammazione, colestasi ostruttiva, assunzione di cibo, esercizio fisico e congestione venosa possono aumentare la LSM e determinare una sovrastima della fibrosi, quindi prima dell'esame è necessario un digiuno di almeno tre ore (21). Inoltre, da una metanalisi su pazienti con NAFLD è emerso che la prestazione diagnostica dei NIT variava anche in relazione al BMI e alla presenza di diabete di tipo 2, risultando migliore nei pazienti con BMI inferiore e senza diabete (22). I NIT hanno inoltre una capacità limitata di distinguere stadi fibrotici adiacenti e non valutano direttamente il ballooning epatocitario e l'infiammazione lobulare (1,21).

1.4.3 Fibrosi e prognosi epatica

Nella MASLD, lo stadio della fibrosi rappresenta il principale fattore prognostico istologico a lungo termine (1,23,24). Secondo le linee guida EASL–EASD–EASO, nei pazienti con malattia confermata istologicamente la fibrosi è il parametro maggiormente associato alla mortalità epatica e al rischio di carcinoma epatocellulare, con un rischio di futuri eventi epatici che aumenta a partire dallo stadio F2 (1). A sostegno di ciò, in una metanalisi comprendente 13 studi e 4.428 pazienti con NAFLD, la fibrosi documentata mediante biopsia risultava associata alla mortalità complessiva ed epatica, al trapianto e agli eventi epatici, con un aumento del rischio al progredire dello stadio (23). Un'altra metanalisi, che ha incluso 17.301 pazienti con NAFLD, ha confrontato la mortalità nei diversi stadi

(24). È emerso che il rischio di mortalità complessiva ed epatica aumentava sostanzialmente con l'avanzare della fibrosi. Rispetto agli stadi F0–F2, gli stadi F3–F4 erano associati a un rischio circa triplo di mortalità complessiva e circa dieci volte maggiore di mortalità epatica. Inoltre, lo stadio F4 presentava un rischio superiore rispetto a F3 (24). Sanyal et al. hanno valutato prospetticamente 1.773 pazienti con NAFLD, seguiti per una mediana di quattro anni (25). Gli episodi di scompenso, comprendenti ascite, encefalopatia ed emorragia da varici, erano rari negli stadi F0–F2, ma aumentavano negli stadi F3 e F4, associati anche a un maggiore rischio di morte (25). Tra gli altri eventi epatici osservati figurava anche il carcinoma epatocellulare (25).

1.5 MASLD e rischio cardiovascolare

Come già anticipato nei precedenti capitoli, la MASLD non è una patologia circoscritta al fegato, ma rappresenta una condizione multisistemica associata a complicanze extraepatiche (1,2). In particolare, questo capitolo esaminerà la rilevanza epidemiologica dell'associazione con il rischio cardiovascolare, le principali manifestazioni cliniche osservate, i meccanismi fisiopatologici ipotizzati e il possibile rapporto con la severità della fibrosi epatica.

1.5.1 Epidemiologia e rilevanza clinica

Le patologie cardiovascolari rappresentano una delle principali componenti della morbidità e della mortalità nei pazienti con steatosi dismetabolica (26). Una delle evidenze epidemiologiche più rilevanti deriva dalla metanalisi di Mantovani et al. condotta su 36 studi osservazionali longitudinali, che ha sintetizzato i dati relativi a oltre 5,8 milioni di individui di mezza età, seguiti per un periodo mediano di 6,5 anni (26). Nel corso del follow-up sono stati registrati circa 100.000 eventi cardiovascolari incidenti, comprendenti esiti fatali e non fatali (26). L'analisi combinata ha mostrato che la presenza di NAFLD era associata a un incremento del 45% del rischio di eventi cardiovascolari fatali e non fatali, con un HR di 1,45 (26). L'associazione persisteva anche dopo aggiustamento per età, sesso, misure di adiposità, diabete mellito e altri comuni fattori di rischio cardiometabolici (26). Tuttavia, come precisano gli autori, la natura osservazionale degli studi non consente di stabilire un rapporto causale diretto (26).

Lo studio prospettico di Ma et al., condotto sui dati della UK Biobank, ha valutato il legame tra NAFLD e rischio cardiovascolare in oltre 215.000 soggetti, seguiti per un periodo mediano di circa 11,6 anni. La presenza di NAFLD è stata stimata mediante il Fatty Liver Index (FLI) (27). Dopo aggiustamento per numerosi fattori demografici e cardiometabolici, la NAFLD risultava associata a un aumento del rischio di eventi cardiovascolari maggiori (HR 1,25) e della mortalità cardiovascolare (HR 1,61). È stata inoltre osservata un'associazione con la mortalità per tutte le cause (HR 1,14) e con la mortalità per infarto miocardico acuto (HR 1,58), mentre non emergeva un incremento statisticamente significativo della mortalità per ictus (27).

Lo studio di coorte nazionale svedese di Issa et al. ha mostrato che, sebbene la MASLD presenti le associazioni relative più elevate con la mortalità epatica e correlata a carcinoma epatocellulare, le malattie cardiovascolari rappresentano una delle principali cause di morte in termini assoluti (28). Nella coorte di 13.099 pazienti con MASLD, la mortalità complessiva risultava quasi raddoppiata (HR 1,85), mentre la mortalità cardiovascolare era aumentata del 54% (HR 1,54) (28). A 15 anni, l'incidenza cumulativa di morte cardiovascolare raggiungeva il 7,2%, rispetto al 2,4% per malattia epatica non-HCC, evidenziando il rilevante contributo delle complicanze cardiovascolari alla prognosi complessiva dei pazienti con MASLD (28).

1.5.2 Principali manifestazioni cardiovascolari

Lo spettro clinico degli eventi cardiovascolari associati alla MASLD include eventi ischemici, come infarto miocardico e ictus, oltre a insufficienza cardiaca e fibrillazione atriale (29).

1.5.2.1 Infarto miocardico

La revisione sistematica e metanalisi di Alon et al., comprendente 20 studi osservazionali, ha evidenziato nei pazienti con NAFLD un rischio di infarto miocardico significativamente maggiore rispetto ai soggetti senza steatosi epatica (OR 1,66), pur in presenza di un'elevata eterogeneità tra gli studi inclusi (29). Più recentemente, Lv e Zhao hanno analizzato specificamente la relazione tra MASLD e infarto miocardico attraverso una metanalisi di dieci studi di coorte: la presenza di MASLD risultava associata a un maggiore rischio di infarto miocardico (HR 1,26) (30). Tuttavia, le evidenze non risultavano del tutto uniformi, poiché l'associazione non raggiungeva la significatività statistica in alcuni sottogruppi analizzati, evidenziando una certa eterogeneità dei risultati disponibili (30).

1.5.2.2 Insufficienza cardiaca

La correlazione tra MASLD e rischio di insufficienza cardiaca è supportata da diverse evidenze metanalitiche. La metanalisi di Alon et al. ha evidenziato un maggiore rischio di scompenso cardiaco nei pazienti con NAFLD rispetto ai soggetti senza malattia, con un OR pari a 1,62 (29). Più recentemente, Mantovani

et al. hanno approfondito questa relazione in una metanalisi comprendente 11 studi longitudinali, oltre 11 milioni di individui e 97.716 nuovi casi di insufficienza cardiaca, con un follow-up mediano di 10 anni (31). La presenza di NAFLD correlava con un incremento del 50% del rischio di scompenso cardiaco di nuova insorgenza (HR 1,50), associazione che persisteva indipendentemente da età, sesso, etnia, adiposità, diabete, ipertensione e altri comuni fattori di rischio cardiovascolare (31). La MASLD è associata anche a una maggiore prevalenza di alterazioni strutturali cardiache, in particolare la sclerosi della valvola aortica e la calcificazione dell'anulus mitralico (32,33). La correlazione è ancora più marcata nei pazienti affetti da diabete di tipo 2 e sembra contribuire ad aumentare l'incidenza di insufficienza cardiaca, sia sistolica che diastolica (32,33).

1.5.2.3 Fibrillazione atriale

Tra le complicanze cardiache connesse alla MASLD, particolare attenzione è stata rivolta al rischio di fibrillazione atriale. La metanalisi di Alon et al. ha evidenziato un'associazione tra NAFLD e questa aritmia, con un OR di 1,27 (29). Tale relazione è stata successivamente supportata dalla metanalisi di Zhou et al., comprendente oltre 14 milioni di soggetti seguiti per un periodo mediano di 7,8 anni, nella quale la NAFLD risultava associata a un incremento del 18% del rischio di fibrillazione atriale di nuova insorgenza (HR 1,18) (34). Come riportato nella review di Anstee et al., la fibrillazione atriale rappresenta quindi la principale aritmia descritta nei pazienti con NAFLD; diversi studi hanno infatti documentato sia una maggiore prevalenza delle forme persistenti o permanenti sia un aumentato rischio di comparsa nel corso del follow-up (35).

1.5.2.4 Rimodellamento cardiaco

Sul piano strutturale, sono state descritte associazioni tra NAFLD e alterazioni precoci della struttura e della funzione miocardica, comprendenti ipertrofia ventricolare sinistra e disfunzione diastolica (35). Questa relazione trova un riscontro nello studio di VanWagner et al., condotto nell'ambito della coorte CARDIA su soggetti di mezza età seguiti per 5 anni (36). La presenza di NAFLD risultava associata a un rischio quasi doppio di sviluppare ipertrofia ventricolare sinistra e geometria ventricolare anomala, anche dopo aggiustamento per i

principali fattori di rischio per scompenso cardiaco (36). Nei pazienti con NAFLD sono state inoltre descritte alterazioni del metabolismo energetico miocardico e della funzione sistolica e diastolica subclinica (35,36). Tuttavia, nello studio CARDIA l'aggiustamento per BMI o adiposità viscerale attenuava molte di queste associazioni, suggerendo un ruolo rilevante dell'obesità nel rapporto tra NAFLD e rimodellamento cardiaco (36).

1.5.3 Patogenesi delle manifestazioni cardiovascolari

La comprensione dei meccanismi fisiopatologici che collegano la MASLD all'aumento del rischio cardiovascolare è resa complessa dalla frequente coesistenza di tradizionali fattori di rischio cardiometabolici, tra cui obesità, insulino-resistenza, diabete mellito di tipo 2, ipertensione arteriosa e fumo (37). Questa sovrapposizione rende difficile stabilire in quale misura la malattia epatica contribuisca in modo indipendente al danno cardiovascolare e quale quota del rischio sia invece spiegata dai comuni meccanismi metabolici sistemici condivisi tra MASLD e malattia cardiovascolare (37,38).

1.5.3.1 Insulino-resistenza e disfunzione adiposa

Sul piano patogenetico, l'insulino-resistenza e la disfunzione del tessuto adiposo viscerale rappresentano importanti meccanismi condivisi che collegano la MASLD al rischio cardiovascolare (37,39). A livello adipocitario, la ridotta capacità dell'insulina di inibire la lipasi determina un aumento della lipolisi e del rilascio di acidi grassi liberi nel circolo, favorendone il flusso verso il fegato e contribuendo allo sviluppo della steatosi (37,39). Parallelamente, l'insulino-resistenza sistemica ed epatica favorisce l'iperglicemia, con conseguenze dirette anche a livello vascolare. L'aumentata formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) promuove infatti la glicazione e il cross-linking del collagene della parete arteriosa, contribuendo all'aumento della rigidità vascolare e alla ritenzione intimale delle lipoproteine aterogene (37).

1.5.3.2 Dislipidemia aterogena

Nella MASLD, le alterazioni del metabolismo epatico delle lipoproteine contribuiscono allo sviluppo di una dislipidemia aterogena, caratterizzata da

ipertrigliceridemia, aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi e dei loro remnants, incremento delle LDL piccole e dense (sdLDL) e riduzione del colesterolo HDL (32,40). In questo contesto, le lipoproteine di origine epatica rappresentano uno dei principali candidati attraverso cui la disfunzione metabolica del fegato può tradursi in un aumento del rischio aterosclerotico (37). L'aumento della lipogenesi de novo e del contenuto intraepatico di trigliceridi favorisce la secrezione di VLDL ricche in trigliceridi, comprese le VLDL1, maggiormente aterogene e precursori delle sdLDL (32,40). Parallelamente, l'insulino-resistenza riduce la clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi attraverso l'aumento di inibitori della lipoproteina lipasi, tra cui ApoC3 e ANGPTL3/8 (40). Una maggiore attività della CETP contribuisce ulteriormente alla formazione delle sdLDL (40). Le lipoproteine contenenti ApoB possono accumularsi e modificarsi nella parete arteriosa, promuovendo l'attivazione immunitaria (32). In particolare, lipoproteine ricche in trigliceridi contenenti ApoC3 e acidi grassi saturi come il palmitato possono attivare TLR2/4 e l'inflammasoma NLRP3, alimentando la via IL-1 β -IL-6-CRP e l'infiammazione vascolare (32).

1.5.3.3 Infiammazione, stress ossidativo e disfunzione endoteliale

Nella MASLD, l'infiammazione sistemica di basso grado, lo stress ossidativo e la disfunzione endoteliale rappresentano meccanismi strettamente interconnessi che possono contribuire alla progressione dell'aterosclerosi (41,42). L'insulino-resistenza e l'iperglicemia possono compromettere la funzione vascolare riducendo la biodisponibilità di ossido nitrico e favorendo l'adesione cellulare all'endotelio (37). A questo si associano alterazioni di mediatori coinvolti nella regolazione della funzione endoteliale, tra cui la dimetilarginina asimmetrica (ADMA), i cui livelli risultano aumentati nella NAFLD, sebbene tale associazione sia influenzata dal concomitante profilo metabolico (41). Parallelamente, il sovraccarico lipidico epatico favorisce un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), attraverso alterazioni del metabolismo mitocondriale degli acidi grassi, della catena respiratoria, del reticolo endoplasmatico e delle NADPH ossidasi (43). L'eccesso di ROS può amplificare la risposta infiammatoria attraverso l'interazione con le vie dell'immunità innata, contribuendo ulteriormente al danno vascolare (43). Coerentemente con questo quadro, nel Framingham Heart Study il grasso epatico è

risultato associato a maggiori livelli di hs-CRP, IL-6, ICAM-1, P-selectina e isoprostani urinari, con associazioni persistenti anche dopo aggiustamento per adiposità viscerale (44). Nel complesso, tali alterazioni delineano un ambiente metabolico, ossidativo e infiammatorio favorevole alla perdita dell'omeostasi endoteliale e all'aterogenesi (41,42).

1.5.3.4 Ruolo dell'intestino

L'alterazione dell'asse intestino-fegato rappresenta un possibile meccanismo coinvolto nel rischio cardiovascolare nella MASLD (38,42). La disbiosi e l'aumentata permeabilità intestinale possono favorire il passaggio di prodotti batterici, come il lipopolisaccaride (LPS), nel circolo portale, contribuendo all'infiammazione epatica e sistemica (38). Inoltre, il microbiota influenza la produzione di metaboliti circolanti, tra cui la trimetilammina-N-ossido (TMAO), i cui alti livelli sono stati associati ad aterosclerosi, infiammazione sistemica e maggiore rischio cardiovascolare (38,42).

1.5.3.5 Meccanismi associati all'aritmogenesi

Oltre alle manifestazioni ischemiche, la MASLD si associa a un aumentato rischio di aritmie, in particolare fibrillazione atriale, sebbene non sia stato definitivamente dimostrato un rapporto causale indipendente dai fattori cardiometabolici concomitanti (35). Tra i meccanismi proposti rientra lo stato infiammatorio sistemico di basso grado che accompagna la malattia, al quale contribuiscono lipotossicità, stress ossidativo e alterazioni metaboliche (35). Le citochine proinfiammatorie possono interferire con l'elettrofisiologia miocardica, modificando l'espressione e la funzione dei canali ionici e favorendo alterazioni della ripolarizzazione (35). Parallelamente, nei pazienti con NAFLD sono state descritte alterazioni strutturali cardiache, tra cui aumento del volume atriale sinistro, e segni di disfunzione autonoma, entrambi potenzialmente coinvolti nella maggiore suscettibilità alle aritmie (35).

1.5.3.6 Meccanismi associati al rimodellamento cardiaco

Il rimodellamento cardiaco osservato nella MASLD potrebbe riflettere non soltanto il contributo dei comuni fattori cardiometabolici, ma anche processi associati alla

severità della malattia epatica (35,45). Studi clinici hanno infatti descritto alterazioni strutturali e funzionali più marcate in presenza di una maggiore severità istologica della malattia (35) o di un incremento della rigidità epatica valutata elastograficamente (45). Infiammazione sistemica, stress ossidativo, lipotossicità e alterazioni metaboliche sono stati proposti come possibili mediatori delle complicanze miocardiche (35,45).

1.5.4 Relazione con la severità della fibrosi epatica

Per quanto riguarda la relazione tra la gravità della fibrosi e gli eventi cardiovascolari, la già citata metanalisi di Mantovani et al. ha analizzato sette studi che hanno valutato la fibrosi mediante istologia o NAFLD Fibrosis Score (NFS), rilevando che gli stadi più avanzati sono associati a un rischio circa 2,5 volte maggiore di eventi cardiovascolari fatali e non fatali (26); gli autori precisano tuttavia che l'eterogeneità dei metodi di stadiazione e dei gruppi di confronto richiede cautela nell'interpretazione delle stime (26).

Ulteriori evidenze derivano dalla metanalisi di Zhang et al., che ha incluso 19 studi longitudinali e oltre 1,48 milioni di soggetti, valutando la correlazione tra punteggi non invasivi di fibrosi ed eventi cardiovascolari (46). Nei pazienti con NAFLD, valori elevati di FIB-4 e NFS erano associati a un aumento del rischio cardiovascolare, rispettivamente con OR pari a 1,87 e 2,59 (46). L'associazione mostrava inoltre un andamento progressivo all'aumentare dei punteggi (46). Risultati di entità simile erano però osservati anche nei soggetti senza NAFLD. Poiché tali punteggi comprendono variabili associate al rischio cardiovascolare, come l'età e, nel caso del NFS, il BMI e il diabete, gli autori ipotizzano che possano agire come marcatori prognostici compositi, quindi questi risultati non consentono di attribuire l'incremento del rischio specificamente alla fibrosi epatica (46). Un supporto istologico rilevante proviene dalla coorte nazionale svedese di Simon et al., che ha incluso 10.422 pazienti con NAFLD confermata mediante biopsia seguiti per un periodo mediano di 13,6 anni (47). L'incidenza degli eventi cardiovascolari maggiori aumentava complessivamente con la severità istologica. Rispetto ai controlli, il rischio risultava maggiore nei pazienti con fibrosi non cirrotica e raggiungeva il valore più elevato nella cirrosi, con HR rispettivamente pari a 1,67 e 2,15 (47). Nel confronto interno alla coorte, la steatoepatite senza fibrosi non

comportava un incremento significativo degli eventi rispetto alla steatosi semplice, mentre l'eccesso assoluto aumentava in presenza di fibrosi (47). Un ulteriore contributo viene dallo studio di Ekstedt et al., in cui 229 pazienti sono stati sottoposti a biopsia e seguiti per una media di 26,4 anni (48). Nel sottogruppo con fibrosi F3–F4, la mortalità cardiovascolare risultava superiore rispetto alla popolazione di riferimento (HR 4,36), mentre un NAS elevato in assenza di fibrosi avanzata non identificava un aumento significativo della mortalità complessiva (48).

1.6 MASLD e alterazioni emostatiche

Il fegato svolge un ruolo centrale nel mantenimento dell'equilibrio emostatico, rappresentando la principale sede di sintesi di molte delle proteine coinvolte nella coagulazione e nella fibrinolisi (49,50). Gli epatociti producono infatti il fibrinogeno e la maggior parte dei fattori procoagulanti solubili, tra cui i fattori II, V, VII, IX, X e XI. A questi si aggiungono alcuni dei principali anticoagulanti naturali, come l'antitrombina e le proteine C e S (51,52). Quest'organo, inoltre, sintetizza anche diversi componenti del sistema fibrinolitico e partecipa alla regolazione della produzione piastrinica attraverso la sintesi di trombopoietina (49,52). Fanno eccezione il fattore VIII (FVIII) e il fattore di von Willebrand (vWF), prodotti prevalentemente dalle cellule endoteliali anziché dagli epatociti (51,53).

Un ulteriore aspetto importante è rappresentato dalla clearance epatica delle proteine coinvolte nell'emostasi e dei prodotti generati durante l'attivazione della coagulazione. La loro rimozione dal circolo contribuisce a limitare nel tempo l'attività coagulativa, evitando che questa si prolunghi o si propaghi in modo eccessivo (50,54). La clearance epatica interviene anche nella regolazione dei livelli plasmatici del FVIII. Quest'ultimo permane in circolo grazie al legame con il vWF, che ne limita la degradazione proteolitica e ne ritarda la rimozione (52).

1.6.1 Il concetto di emostasi ribilanciata nelle epatopatie croniche

Storicamente, l'epatopatia è stata classificata e trattata come un disturbo prevalentemente emorragico (50,52,55).

Questa interpretazione derivava in larga parte dal frequente riscontro di alterazioni dei comuni parametri di laboratorio, quali la trombocitopenia, il prolungamento del tempo di protrombina (PT/INR) e del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), associati alla riduzione plasmatica dei fattori della coagulazione di sintesi epatica (50,52). Ad oggi, grazie a studi condotti sulle patologie epatiche croniche e in particolare sulla cirrosi, questa visione unidirezionale è stata progressivamente superata (51,52).

Il concetto di “emostasi ribilanciata” è stato proposto da Lisman e Porte nel 2010 (55) e successivamente sviluppato da Tripodi e Mannucci nel 2011 (52). Il modello è stato poi ripreso e aggiornato in un lavoro dell’ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) pubblicato nel 2021 (50). Va sottolineato che il concetto di emostasi ribilanciata è stato elaborato principalmente nel contesto delle epatopatie croniche e della cirrosi (50). Si tratta quindi di un modello fisiopatologico generale e non di una caratterizzazione specifica della MASLD. Le alterazioni dell’emostasi associate a questa condizione saranno analizzate nei paragrafi successivi.

Il ribilanciamento dell’emostasi deriva dalla presenza di alterazioni che interessano le diverse fasi del processo fisiopatologico emostatico (50–52). Per quanto riguarda l’emostasi primaria, la riduzione del numero di piastrine (trombocitopenia) è almeno in parte compensata dall’aumento del fattore di von Willebrand (vWF) e dalla contemporanea riduzione della metalloproteasi ADAMTS13. Queste modificazioni contribuiscono a mantenere l’adesione piastrinica nonostante la riduzione della conta piastrinica (50,52). Nella fase coagulativa la ridotta sintesi dei fattori procoagulanti si accompagna a una diminuzione dei principali anticoagulanti naturali (antitrombina, proteina C e proteina S) e a un aumento del fattore VIII, preservando la capacità complessiva di generare trombina (50–52). Nel processo di fibrinolisi si osservano alterazioni contrapposte: la riduzione di TAFI e α 2-antiplasmina e l’aumento del t-PA favoriscono la fibrinolisi, mentre la diminuzione del plasminogeno e l’aumento del PAI-1 esercitano un effetto opposto (50–52). Ne deriva un equilibrio emostatico complessivamente conservato ma più fragile e meno stabile rispetto a quello dei soggetti sani (50,51).

Questo equilibrio può infatti essere alterato dalla presenza di condizioni cliniche intercorrenti, con un possibile spostamento verso un fenotipo prevalentemente emorragico oppure trombotico (50,51).

In questo scenario, i test di routine come PT/INR, aPTT e conta piastrinica presentano importanti limiti nella valutazione dell’emostasi (50–52). Questi esami risentono soprattutto della riduzione dei fattori procoagulanti e non tengono conto della concomitante diminuzione degli anticoagulanti naturali. Analogamente, la conta piastrinica isolata non riflette la compensazione derivante dall’aumento del vWF e dalla riduzione di ADAMTS13. Di conseguenza, tali parametri non sono in

grado di rappresentare in modo adeguato l'equilibrio emostatico complessivo dei pazienti con epatopatia cronica e non consentono di predire efficacemente il rischio emorragico (50,52).

1.6.2 Alterazioni emostatiche nella MASLD

Nel contesto delle alterazioni emostatiche, la MASLD si associa a specifiche e complesse modificazioni che coinvolgono la funzione piastrinica, la coagulazione e la fibrinolisi (49,56–59). Nei paragrafi successivi verranno analizzate in dettaglio tali alterazioni e le relative correlazioni cliniche.

1.6.2.1 Fattori procoagulanti e anticoagulanti naturali

Nella MASLD sono state descritte alterazioni sia dei fattori procoagulanti sia degli anticoagulanti naturali. Tripodi et al. hanno studiato 113 pazienti con NAFLD, dei quali alcuni con steatosi semplice, altri con NASH e altri con cirrosi (60). L'attività del fattore VIII era maggiore nei pazienti con NASH e raggiungeva i valori più elevati nella cirrosi metabolica; la proteina C e l'antitrombina risultavano significativamente ridotte soltanto nei pazienti cirrotici (60). Nella stessa coorte, il rapporto tra fattore VIII e proteina C, utilizzato come indice dello squilibrio procoagulante, aumentava progressivamente con la gravità della malattia (60). Anche l'ETP-ratio, ottenuto confrontando la generazione di trombina in presenza e in assenza di trombomodulina (TM), era aumentato e raggiungeva i valori maggiori nella cirrosi, indicando una minore risposta al sistema anticoagulante della proteina C (60). Risultati parzialmente concordanti sono stati ottenuti da Potze et al. in 68 pazienti con NAFLD istologicamente documentata (56). Nei pazienti con steatosi semplice o NASH, vWF, proteina C e antitrombina erano sostanzialmente conservati, mentre il vWF aumentava e gli anticoagulanti naturali si riducevano in presenza di cirrosi (56). Inoltre, la generazione di trombina in presenza di trombomodulina era complessivamente simile tra pazienti e controlli, suggerendo un profilo coagulativo globale conservato nelle forme non cirrotiche (56). Analogamente, Eriksen et al., studiando 25 pazienti non diabetici con steatosi semplice o NASH e fibrosi non superiore a F2, hanno riscontrato livelli di proteina C, proteina S e antitrombina generalmente compresi negli intervalli di riferimento (58). Il rapporto con la gravità del danno epatico è stato approfondito da Valenti et

al. in 581 soggetti con almeno tre alterazioni metaboliche (61). La steatosi valutata mediante CAP (Controlled Attenuation Parameter) non era associata a differenze significative nei livelli di vWF, fattore VIII o nel rapporto fattore VIII/proteina C (61). Al contrario, il FIB-4 era associato a livelli più elevati di vWF e fattore VIII, mentre sia FIB-4 sia liver stiffness erano associati a minore attività della proteina C e a un rapporto fattore VIII/proteina C più elevato (61). Infine, uno studio di Lombardi et al. ha valutato pazienti con MASLD e diabete di tipo 2 con test di generazione della trombina (62). Una maggiore liver stiffness si associava a un aumento del rapporto fattore VIII/proteina C e dell'ETP-TM ratio, insieme a una riduzione degli anticoagulanti naturali (62). L'inclusione del genotipo PNPLA3 nei modelli modificava alcune delle associazioni tra liver stiffness e parametri coagulativi; gli autori suggerivano pertanto una possibile interazione tra predisposizione genetica, fibrosi epatica e coagulazione (62).

Nel complesso, lo squilibrio procoagulante appare più evidente nelle forme fibrotiche avanzate (60–62), mentre nelle fasi non cirrotiche i risultati restano discordanti (56,58).

1.6.2.2 Fibrinogeno, formazione del coagulo e fibrinolisi

Nella MASLD sono state descritte alterazioni sia della concentrazione sia delle caratteristiche strutturali del fibrinogeno. Nello studio di Lombardi et al., i pazienti con MASLD e diabete presentavano livelli di fibrinogeno superiori rispetto ai controlli sani (62). Potze et al. hanno osservato una tendenza analoga, insieme alla formazione di coaguli meno permeabili e caratterizzati da una maggiore densità delle fibre di fibrina (56). Modificazioni simili erano però presenti anche nei controlli sovrappeso e la densità della rete fibrinica correlava con l'indice di massa corporea, suggerendo un possibile contributo dell'adiposità (56).

Diversi studi hanno evidenziato una riduzione della capacità fibrinolitica. Potze et al. hanno riscontrato un prolungamento del tempo di lisi nei soggetti sovrappeso e nei pazienti con NAFLD non cirrotica (56). Evidenze più nette provengono da Eriksen et al., nei quali il tempo necessario alla lisi del coagulo era marcatamente prolungato sia nella steatosi semplice sia nella NASH rispetto ai controlli sani (58). Un ruolo centrale in questa condizione è attribuito all'inibitore dell'attivatore del

plasminogeno-1 (PAI-1), che ostacola l'attivazione del plasminogeno e limita la degradazione della fibrina (63). Nello studio di Eriksen et al., i livelli di PAI-1 erano aumentati nella maggior parte dei pazienti e risultavano più elevati nella NASH rispetto alla steatosi semplice (58). La metanalisi di Li et al., comprendente 23 studi caso-controllo, ha confermato livelli circolanti di PAI-1 complessivamente maggiori nei pazienti con MASLD, sebbene con elevata eterogeneità tra gli studi e una bassa certezza complessiva dell'evidenza (63).

Il legame con la gravità del danno epatico è meno definito. Eriksen et al. non hanno rilevato differenze nel tempo di lisi tra steatosi semplice e NASH, nonostante i maggiori livelli di PAI-1 nella NASH (58). Inoltre, Potze et al. non hanno osservato associazioni tra tempo di lisi e caratteristiche istologiche della malattia (56). Al contrario, i parametri fibrinolitici risultavano correlati con adiposità e insulino-resistenza, indicando che il profilo metabolico potrebbe contribuire in misura rilevante all'ipofibrinolisi associata alla MASLD (56,58). Il contributo indipendente della fibrosi epatica rimane quindi da chiarire.

1.6.2.3 Piastrine

Nella MASLD sono state descritte alterazioni quantitative e funzionali delle piastrine, la cui espressione sembra variare con la gravità della malattia epatica (57,59,64). La conta piastrinica tende a ridursi con la progressione della fibrosi: rimane generalmente conservata nelle fasi iniziali, mentre la piastrinopenia diviene più frequente nella fibrosi avanzata e nella cirrosi (57,59,64). Nella malattia epatica avanzata, tale riduzione dipende da più meccanismi, tra cui il sequestro splenico associato all'ipertensione portale, la minore produzione epatica di trombopoietina e l'aumento della distruzione o del consumo delle piastrine (65). Alcuni studi hanno inoltre riportato un aumento del volume piastrinico medio, sebbene questo reperto non implichi necessariamente una maggiore capacità di aggregazione (57–59).

Anche il profilo metabolico può influenzare la funzione piastrinica: obesità, insulino-resistenza, iperglicemia, dislipidemia e stress ossidativo favoriscono l'attivazione e la maggiore reattività delle piastrine (57,59). Una volta attivate, queste rilasciano mediatori contenuti nei granuli e possono interagire con l'endotelio, le cellule immunitarie e le cellule epatiche, contribuendo

all'infiammazione intraepatica e alla fibrogenesi (57,59). Questi meccanismi sono tuttavia sostenuti in larga parte da evidenze sperimentali e il loro peso nella progressione della MASLD umana non è ancora completamente definito (59).

Gli studi funzionali condotti nell'uomo hanno fornito risultati non uniformi. Potze et al. non hanno riscontrato un aumento dell'attivazione basale o della risposta agli agonisti nei pazienti con steatosi semplice o NASH non cirrotica; nei pazienti cirrotici è emersa invece una minore risposta agli stimoli in vitro (56). Anche Eriksen et al. non hanno osservato una maggiore aggregazione piastrinica nelle forme non cirrotiche (58).

Dati più recenti provengono dallo studio trasversale di Castelli et al., che ha valutato 192 soggetti suddivisi in controlli, MASLD con fibrosi non avanzata e fibrosi avanzata o cirrosi sulla base della liver stiffness (64). Nei pazienti classificati come $\leq F2$, le piastrine mostravano una maggiore adesione al collagene e una più ampia componente con attività procoagulante (64). Nei soggetti con fibrosi avanzata o cirrosi erano invece più elevati i marcatori di attivazione piastrinica in vivo e l'adesione rimaneva aumentata, mentre la risposta agli agonisti risultava ridotta (64).

1.7 MASLD e danno vascolare subclinico

Il danno vascolare subclinico consiste in alterazioni strutturali e funzionali della parete vascolare rilevabili in assenza di manifestazioni cardiovascolari clinicamente evidenti (66). La sua valutazione può basarsi su diversi indicatori, tra cui lo spessore medio-intimale carotideo (cIMT), la calcificazione coronarica, la funzione endoteliale e la rigidità arteriosa (66). Negli studi condotti in popolazioni con NAFLD, tali parametri sono risultati generalmente alterati rispetto ai controlli; nel complesso, questi risultati sostengono l'esistenza di un'associazione tra NAFLD e aterosclerosi subclinica (66). Una metanalisi che ha incluso anche le placche carotidee tra gli esiti morfologici ha confermato tale associazione attraverso quattro differenti categorie di indicatori vascolari subclinici (67). Tra i distretti suscettibili di valutazione mediante metodiche non invasive rientrano il circolo carotideo, l'aorta addominale e le arterie degli arti inferiori (68).

I paragrafi successivi esamineranno il danno carotideo, l'arteriopatia periferica e le modificazioni dell'aorta addominale.

1.7.1 Danno carotideo: spessore intima-media e placche

Nella revisione sistematica con metanalisi di Khoshbaten et al., comprendente 59 studi, i soggetti con NAFLD presentavano valori di cIMT mediamente superiori di circa 0,12 mm rispetto ai controlli (69). Nello stesso lavoro, l'analisi di 17 studi dedicati alle placche carotidee ha rilevato un'associazione tra la NAFLD e la presenza di tali lesioni, con un OR complessivo di circa 1,36 (69).

Ulteriori elementi provengono dalla metanalisi di Wong et al., che ha incluso 44 studi dedicati al cIMT (70). La presenza di NAFLD risultava associata sia a valori medi di cIMT più elevati sia a una maggiore probabilità di presentare un cIMT aumentato (70). Tale differenza era osservabile sia negli studi basati su confronti non aggiustati sia in quelli che tenevano conto di potenziali fattori confondenti (70). Nelle analisi stratificate non emergevano differenze statisticamente significative tra gli studi condotti in popolazioni asiatiche e quelli condotti in popolazioni occidentali. Un risultato differente emergeva invece nel sottogruppo costituito esclusivamente da pazienti con diabete mellito di tipo 2, nel quale non veniva

rilevata una differenza significativa nei valori medi di cIMT tra soggetti con e senza NAFLD (70).

Lo studio di Sinn et al. ha fornito informazioni sulla comparsa del danno carotideo nel tempo (71). Gli autori hanno seguito 8.020 uomini inizialmente privi di aterosclerosi carotidea subclinica per un periodo mediano di 3,3 anni, valutando nel tempo la presenza di NAFLD mediante ecografia. L'endpoint dello studio era rappresentato dalla comparsa di aterosclerosi carotidea subclinica, definita dalla presenza di un cIMT patologicamente aumentato o di una placca carotidea (71). I soggetti con NAFLD persistente mostravano un rischio maggiore di sviluppare tale endpoint rispetto a quelli senza NAFLD. L'associazione rimaneva significativa dopo l'aggiustamento per età, fumo, consumo di alcol, BMI e variazione ponderale, ma si attenuava fino a perdere significatività dopo l'ulteriore correzione per pressione arteriosa, glicemia, profilo lipidico e relative terapie (71). Secondo gli autori, questo risultato suggerisce che i fattori metabolici possano mediare parte dell'associazione tra NAFLD e sviluppo di aterosclerosi carotidea (71).

1.7.2 Arteriopatia periferica

L'arteriopatia periferica (PAD) degli arti inferiori è una manifestazione dell'aterosclerosi sistemica e può essere presente anche in soggetti asintomatici (72). La valutazione iniziale si basa principalmente sull'indice caviglia-braccio (ABI), ottenuto dal rapporto tra la pressione sistolica misurata alla caviglia e quella brachiale. Un valore $\leq 0,90$ è considerato patologico, mentre valori $> 1,40$ indicano arterie non comprimibili e possono rendere l'esame meno affidabile, soprattutto nei pazienti con diabete o malattia renale cronica (72).

L'associazione tra steatosi epatica metabolica e PAD è stata valutata da Song et al. in un'ampia popolazione cinese. Nell'analisi trasversale, comprendente oltre 100.000 partecipanti, la PAD era più frequente nei soggetti con MAFLD rispetto a quelli senza malattia epatica (2,7% contro 2,2%) (73). L'associazione emergeva anche nell'analisi longitudinale: dopo circa tre anni, nuovi casi di PAD erano stati rilevati nel 3,3% dei soggetti con MAFLD e nell'1,8% dei controlli (73). La frequenza della PAD tendeva inoltre ad aumentare con il numero delle alterazioni metaboliche associate (73).

Risultati concordanti sono stati riportati da Zou et al. in 2.646 pazienti con diabete di tipo 2. La PAD, definita in questo caso esclusivamente da un ABI $<0,90$, era presente nel 12,8% dei pazienti con NAFLD e nel 7,8% di quelli senza NAFLD (74). L'associazione, tuttavia, si riduceva dopo aver considerato i principali fattori metabolici (74).

1.7.3 Aorta addominale: diametro e dilatazione aneurismatica

Il coinvolgimento dell'aorta addominale può essere studiato considerando il diametro vascolare come parametro strutturale continuo (75) oppure valutando la presenza di un aneurisma, definito come una dilatazione localizzata superiore al 50% del normale calibro aortico (76). Cai et al. hanno esaminato la relazione tra contenuto di grasso epatico e diametro dell'aorta infrarenale nelle coorti tedesche SHIP e KORA (75). In SHIP, un maggiore contenuto di grasso epatico era associato a un diametro aortico superiore dopo aggiustamento per età e sesso, ma l'associazione scompariva con l'inclusione del BMI nel modello. In KORA non emergevano associazioni significative (75). Jia et al. hanno valutato prospetticamente la comparsa di aneurisma dell'aorta addominale in soggetti con e senza MAFLD alla UK Biobank: la MAFLD risultava associata a una maggiore incidenza di aneurisma anche dopo l'aggiustamento multivariato (76).

1.7.4 Associazione con la gravità della fibrosi epatica

Diversi studi hanno valutato se il coinvolgimento vascolare aumenti in relazione alla gravità della fibrosi epatica, ma l'interpretazione dei risultati richiede cautela poiché la fibrosi è stata prevalentemente stimata mediante punteggi non invasivi, i cui valori dipendono anche da variabili associate al rischio vascolare (76–78).

Nella metanalisi di Jamalinia et al., comprendente 12 studi e 4.725 pazienti con NAFLD, la fibrosi risultava associata a una maggiore probabilità di aterosclerosi subclinica. L'entità dell'associazione aumentava nei sottogruppi con fibrosi più avanzata: l'OR era 1,64 per fibrosi $\geq F1$, 2,22 per $\geq F2$ e 3,42 per $\geq F3$ (79).

Nella coorte di Sinn et al., valori elevati di NFS e FIB-4 nei partecipanti con NAFLD erano associati alla successiva comparsa di un cIMT patologico o di placche carotidee (71). Nelle coorti UK Biobank e ARIC, punteggi di fibrosi più

elevati nei soggetti con MAFLD erano associati a una maggiore incidenza di arteriopatia periferica (78). Nella UK Biobank, le categorie superiori di NFS e FIB-4 presentavano HR rispettivamente di 2,92 e 2,36 rispetto ai partecipanti senza MAFLD (78). Anche l'incidenza di aneurisma dell'aorta addominale aumentava progressivamente nelle categorie più elevate di NFS, con risultati concordanti per FIB-4 e Forns score (76).

Rimane però incerto quanto tali associazioni siano riconducibili alla fibrosi epatica. Nello studio di Sinn et al., la relazione tra persistenza della NAFLD e sviluppo di aterosclerosi carotidea perdeva significatività dopo l'aggiustamento per pressione arteriosa, glicemia, lipidi e relativi trattamenti, indicando il possibile contributo dei fattori metabolici condivisi (71). In uno studio trasversale comprendente 12.095 partecipanti, NFS e FIB-4 erano associati all'aterosclerosi carotidea nel sottogruppo con NAFLD, ma l'età mostrava una capacità predittiva superiore; inoltre, l'aggiunta dei due punteggi non migliorava significativamente il modello comprendente i principali fattori di rischio (77). Tan et al., in un piccolo studio, non hanno invece rilevato un'associazione tra fibrosi avanzata valutata mediante elastografia transitoria e cIMT aumentato; l'età avanzata era l'unico fattore associato indipendentemente a tale reperto. Gli autori sottolineavano tuttavia la limitata numerosità del campione (80).

2 SCOPO DELLO STUDIO

Il presente studio, condotto in una coorte di pazienti con metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), si propone di valutare la relazione tra severità della fibrosi epatica e le alterazioni dell'assetto emostatico.

L'obiettivo primario è valutare se la presenza di fibrosi epatica avanzata (F3–F4) sia associata a un differente profilo emostatico rispetto agli stadi di fibrosi non avanzata (F0–F2), mediante la valutazione integrata della componente piastrinica, dei fattori procoagulanti, degli anticoagulanti naturali, della fibrinolisi e dei parametri viscoelastici.

Gli obiettivi secondari sono valutare l'associazione tra la severità della fibrosi epatica, il danno vascolare subclinico e lo stato infiammatorio sistemico, al fine di caratterizzare in maniera integrata il profilo emostatico, vascolare e infiammatorio associato alla progressione della MASLD.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione dello studio e criteri di selezione

Sono stati consecutivamente inclusi nello studio 616 pazienti con diagnosi di metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). La diagnosi di MASLD è stata definita secondo le linee guida EASL–EASD–EASO e il consenso Delphi del 2023, richiedendo la presenza di steatosi epatica, documentata mediante imaging o biopsia, associata ad almeno un criterio cardiometabolico e a un consumo alcolico inferiore a 20 g/die nelle donne e 30 g/die negli uomini (1,3). I criteri cardiometabolici comprendono: indice di massa corporea ≥ 25 kg/m² oppure circonferenza vita ≥ 94 cm negli uomini e ≥ 80 cm nelle donne, con soglie variabili in base all'etnia; glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dL, glicemia a due ore dall'OGTT ≥ 140 mg/dL, HbA1c $\geq 5,7\%$, diagnosi di diabete mellito di tipo 2 o terapia ipoglicemizzante; pressione arteriosa $\geq 130/85$ mmHg o terapia antipertensiva; trigliceridi ≥ 150 mg/dL o terapia specifica; colesterolo HDL ≤ 40 mg/dL negli uomini e ≤ 50 mg/dL nelle donne o terapia specifica (1,3).

I criteri di esclusione comprendevano: età superiore a 80 anni; presenza di altre epatopatie acute o croniche; consumo di alcol superiore a 14 unità alcoliche/settimana negli uomini e a 7 unità/settimana nelle donne; anamnesi di trombosi arteriosa o venosa nell'anno precedente l'arruolamento; terapia anticoagulante a dose terapeutica; infezioni acute nei tre mesi precedenti; insufficienza cardiaca acuta o cronica.

3.2 Raccolta dei dati clinici e laboratoristici

Per ciascun paziente sono stati raccolti dati demografici, antropometrici, clinici e anamnestici. In particolare, sono stati considerati età, sesso, peso, indice di massa corporea (body mass index, BMI), circonferenza vita, pressione arteriosa sistolica e diastolica, presenza di obesità, ipertensione arteriosa, dislipidemia e diabete mellito. Sono state inoltre raccolte informazioni relative all'abitudine tabagica, alla presenza di malattia cardiovascolare aterosclerotica, a eventuali pregresse malattie trombotiche e all'utilizzo di terapia antiaggregante. La caratterizzazione laboratoristica generale ha incluso la valutazione dell'emocromo, con determinazione dell'emoglobina e della conta leucocitaria, degli enzimi epatici aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e gamma-

glutamyltransferasi (GGT), della glicemia a digiuno e del profilo lipidico, comprendente colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL e trigliceridi. Le indagini specificamente rivolte alla caratterizzazione del profilo emostatico e dello stato infiammatorio sistemico sono descritte nei paragrafi successivi.

3.3 Valutazione della fibrosi epatica

La severità della fibrosi epatica è stata valutata mediante elastografia transiente (FibroScan®), attraverso la misurazione della liver stiffness measurement (LSM), espressa in kPa. È stato inoltre registrato il Controlled Attenuation Parameter (CAP), utilizzato per la caratterizzazione del grado di steatosi epatica. Sulla base dei valori di LSM, sono stati applicati i cut-off indicati dalle linee guida: valori inferiori a 8 kPa erano considerati indicativi dell'assenza di fibrosi avanzata, valori compresi tra 8 e <12 kPa costituivano una zona intermedia, mentre valori ≥ 12 kPa erano indicativi della presenza di fibrosi avanzata (1). Per le analisi comparative, i pazienti sono stati classificati in due gruppi: pazienti con fibrosi non avanzata (F0–F2) e pazienti con fibrosi avanzata (F3–F4).

La stratificazione in base alla severità della fibrosi è stata utilizzata per il confronto dei parametri clinici, emostatici, vascolari e infiammatori.

3.4 Valutazione emostatica, vascolare e infiammatoria

3.4.1 Valutazione dell'emostasi

La caratterizzazione del profilo emostatico ha incluso la valutazione integrata della componente piastrinica, dei fattori procoagulanti, degli anticoagulanti naturali, del sistema fibrinolitico e delle proprietà viscoelastiche del coagulo.

La componente piastrinica è stata valutata mediante determinazione della conta piastrinica e test di aggregazione piastrinica eseguiti su sangue intero mediante aggregometro MULTIPLE®. Sono state considerate le risposte all'adenosina difosfato (ADP), al thrombin receptor-activating peptide (TRAP) e all'acido arachidonico (ASPI).

La valutazione dei fattori procoagulanti ha incluso la determinazione del fibrinogeno e dell'attività del fattore VIII. Gli anticoagulanti naturali sono stati studiati mediante determinazione dell'attività coagulometrica e cromogenica e della concentrazione antigenica della proteina C, nonché mediante dosaggio della

proteina S e dell'antitrombina. La valutazione del sistema fibrinolitico ha compreso la determinazione del plasminogeno e dell'antigene dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1).

La valutazione viscoelastica della coagulazione è stata effettuata su sangue intero mediante tromboelastometria rotazionale (rotational thromboelastometry, ROTEM®). Sono stati considerati i test INTEM (intrinsic pathway activation), EXTEM (extrinsic pathway activation) e FIBTEM (fibrin-based clot assessment). Per ciascun test è stata valutata la maximum clot firmness (MCF), espressa in millimetri. La generazione di trombina è stata valutata mediante test eseguiti in assenza e in presenza di trombomodulina (TM). Sono stati considerati il lag time, l'endogenous thrombin potential (ETP), il peak thrombin, il time to peak (ttPeak), il Velocity Index e lo StartTail. In presenza di trombomodulina sono stati inoltre calcolati l'ETP inhibition, espressa come percentuale di inibizione dell'ETP, e l'ETP ratio, definito come rapporto tra l'ETP in presenza e in assenza di trombomodulina.

3.4.2 Valutazione del danno vascolare subclinico

Il danno vascolare subclinico è stato valutato mediante studio ecografico di differenti distretti vascolari.

A livello carotideo sono stati misurati lo spessore medio-intimale della carotide comune destra e sinistra (carotid intima-media thickness, cIMT) e la presenza di placche aterosclerotiche a destra e a sinistra mediante ecocolor-Doppler dei tronchi sovra-aortici. È stata inoltre considerata la presenza di qualsiasi placca carotidea, definita come la presenza di almeno una placca a livello carotideo destro e/o sinistro. A livello dell'aorta addominale è stato misurato il diametro aortico mediante ecocolor-Doppler. La valutazione vascolare degli arti inferiori è stata effettuata mediante ecocolor-Doppler, per la rilevazione di eventuali placche aterosclerotiche, e mediante determinazione dell'indice caviglia-braccio (ankle-brachial index, ABI). Un valore di ABI <0,90 è stato considerato patologico. È stata infine considerata la presenza di qualsiasi placca aterosclerotica, definita come la presenza di almeno una placca a livello della carotide destra e/o sinistra e/o del distretto arterioso degli arti inferiori.

3.4.3 Valutazione dell'infiammazione sistemica

Lo stato infiammatorio sistemico è stato valutato mediante determinazione della proteina C-reattiva ad alta sensibilità (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP), dell'interleuchina-6 (IL-6) e dell'interleuchina-1 β (IL-1 β).

3.5 Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come mediana e intervallo interquartile (interquartile range, IQR), mentre le variabili categoriche sono state riportate come frequenze assolute e percentuali.

Le caratteristiche demografiche, cardiometaboliche, emostatiche, vascolari e infiammatorie sono state confrontate tra i pazienti con fibrosi non avanzata (F0–F2) e quelli con fibrosi avanzata (F3–F4). Le variabili continue sono state confrontate mediante test di Mann–Whitney, mentre le variabili categoriche sono state confrontate mediante test del χ^2 o test esatto di Fisher.

Per i test di aggregazione piastrinica è stata inoltre eseguita un'analisi separata dopo l'esclusione dei pazienti in terapia antiaggregante. Le associazioni tra liver stiffness measurement (LSM) e parametri emostatici sono state valutate mediante il coefficiente di correlazione di Spearman. Con lo stesso metodo sono state analizzate le relazioni tra la risposta alla trombomodulina, espressa mediante ETP ratio ed ETP inhibition, e i principali fattori emostatici. Per valutare l'associazione tra la presenza di fibrosi avanzata e i parametri emostatici sono stati utilizzati modelli di regressione logistica multivariata, considerando la fibrosi F3–F4 come variabile dipendente. Ciascun parametro emostatico è stato valutato in un modello separato, aggiustato per età, sesso, BMI e diabete mellito. Gli odds ratio (OR) sono stati calcolati per incremento di una deviazione standard del parametro analizzato.

Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante SPSS.

4 RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione generale

La popolazione dello studio comprendeva 616 pazienti, con un'età mediana di 62 [52–69] anni e una prevalenza del sesso maschile del 62,0%. Il peso mediano era di 85 [75–95] kg, con un BMI mediano di 29 [26–32] kg/m² e una circonferenza vita mediana di 102 [94–113] cm. La pressione arteriosa sistolica e diastolica mediana era rispettivamente di 130 [120–140] mmHg e 80 [70–85] mmHg (Tabella I).

La popolazione presentava un'elevata prevalenza di fattori di rischio cardiometabolico. L'obesità era presente nel 46,1% dei pazienti, l'ipertensione arteriosa nel 58,7%, la dislipidemia nel 73,8% e il diabete mellito nel 30,3%. I fumatori attuali rappresentavano il 14,1% della popolazione, mentre il 26,8% erano ex fumatori. La malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD) era presente nel 14,5% dei pazienti e una precedente malattia trombotica nell'8,9%. Complessivamente, 75 pazienti (12,2%) erano in terapia antiaggregante (Tabella I). La tabella I riassume le principali caratteristiche della popolazione.

Tabella I. Caratteristiche della popolazione generale.

Caratteristica	Popolazione complessiva
N	616
Maschi, n (%)	382 (62.0%)
Femmine, n (%)	234 (38.0%)
Età, anni	62 [52–69]
Peso, kg	85 [75–95]
BMI, kg/m ²	29 [26–32]
Circonferenza vita, cm	102 [94–113]
PAS, mmHg	130 [120–140]
PAD, mmHg	80 [70–85]
Obesità, n/N (%)	273/592 (46.1%)
Ipertensione arteriosa, n/N (%)	349/595 (58.7%)
Dislipidemia, n/N (%)	436/591 (73.8%)
Diabete mellito, n/N (%)	180/595 (30.3%)
Fumatori attuali, n/N (%)	84/594 (14.1%)
Ex fumatori, n/N (%)	159/594 (26.8%)
ASCVD, n/N (%)	85/587 (14.5%)
Pregressa malattia trombotica, n/N (%)	53/596 (8.9%)
Terapia antiaggregante, n (%)	75 (12.2%)

I dati sono espressi come n (%), n/N (%) o mediana [IQR]. BMI: body mass index; PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; ASCVD: malattia cardiovascolare aterosclerotica; IQR: intervallo interquartile.

4.1.1 Profilo epatico e grado di fibrosi

Il grado di fibrosi epatica era disponibile per 587 dei 616 pazienti inclusi nello studio (95,3%). La maggior parte dei soggetti presentava fibrosi assente o di grado lieve-moderato: 247 pazienti (42,1%) erano classificati come F0, 216 (36,8%) come F1 e 75 (12,8%) come F2. La fibrosi avanzata, definita come stadio F3–F4, era presente in 49 pazienti (8,3%) (Tabella II).

Per quanto riguarda il grado di steatosi, 44 pazienti (7,5%) erano classificati come S0, 146 (24,9%) come S1, 143 (24,4%) come S2 e 254 (43,3%) come S3, che rappresentava il grado più frequente nella popolazione studiata (Tabella III). Il Controlled Attenuation Parameter (CAP) presentava un valore mediano di 284 [255–316] dB/m, mentre la Liver Stiffness Measurement (LSM) mostrava un valore mediano di 5,3 [4,3–6,8] kPa.

Tabella II. Grado di fibrosi epatica nella popolazione

Grado di fibrosi	n (%)
F0	247 (42.1%)
F1	216 (36.8%)
F2	75 (12.8%)
F3–F4	49 (8.3%)

F0: assenza di fibrosi; F1: fibrosi lieve; F2: fibrosi moderata; F3-F4: fibrosi avanzata. I dati sono espressi come n (%).

Tabella III. Grado di steatosi nella popolazione

Grado di steatosi	n (%)
S0	44 (7.5%)
S1	146 (24.9%)
S2	143 (24.4%)
S3	254 (43.3%)

S0: assenza di steatosi; S1: steatosi lieve; S2: steatosi moderata; S3: steatosi severa. I dati sono espressi come n (%).

4.1.2 Profilo ematologico, metabolico ed emostatico

Dal punto di vista ematologico, la popolazione presentava valori mediani di emoglobina pari a 135 [125,5–142] g/L, una conta piastrinica di 180 [153–209] $\times 10^9/L$ e una conta leucocitaria di 5,6 [4,7–6,7] $\times 10^9/L$. Per quanto riguarda il profilo epatico, i valori mediani di AST, ALT e GGT erano rispettivamente 28 [22–37] U/L, 30 [21–47] U/L e 33,5 [21–66] U/L. Analizzando il profilo metabolico, la glicemia a digiuno mediana era di 100 [90–115] mg/dL; il colesterolo totale era pari a 172 [144–201,5] mg/dL, l'HDL a 48 [39–57] mg/dL e i trigliceridi a 104 [79–140] mg/dL. La hs-CRP presentava un valore mediano di 1,22 [0,62–2,43] mg/L (Tabella IV).

Per quanto riguarda il profilo emostatico, i valori mediani di antigene della proteina C, attività della proteina C, proteina S totale e antitrombina erano rispettivamente 118 [102–136] %, 96 [88–111] %, 105 [94–118] % e 102 [93–110] %. Il fibrinogeno presentava un valore mediano di 363 [316–411] mg/dL, mentre il fattore VIII era pari a 140 [111–176] %. Alla valutazione ROTEM, l'MCF mediano era di 63 [59–66] mm nell'INTEM e di 64,5 [61–68] mm nell'EXTEM. Nei test di generazione di trombina, l'ETP (endogenous thrombin potential) mediano era pari a 1285 [1142–1439] nM·min e il peak thrombin a 259 [224–291] nM (Tabella IV).

Tabella IV. Profilo ematologico, metabolico ed emostatico della popolazione generale.

Variabile	Totale
Emoglobina, g/L	135 [125.5–142]
Piastrine, $\times 10^9/L$	180 [153–209]
WBC, $\times 10^9/L$	5.6 [4.7–6.7]
AST, U/L	28 [22–37]
ALT, U/L	30 [21–47]
GGT, U/L	33.5 [21–66]
Glicemia a digiuno, mg/dL	100 [90–115]
Colesterolo totale, mg/dL	172 [144–201.5]
HDL, mg/dL	48 [39–57]
Trigliceridi, mg/dL	104 [79–140]
hs-CRP, mg/L	1.22 [0.62–2.43]
Proteina C antigena, %	118 [102–136]
Proteina C attività coagulometrica, %	96 [88–111]
Proteina S totale Ag, %	105 [94–118]
Antitrombina, %	102 [93–110]
Fibrinogeno, mg/dL	363 [316–411]
FVIII, %	140 [111–176]
ROTEM INTEM-MCF, mm	63 [59–66]
ROTEM EXTEM-MCF, mm	64.5 [61–68]
Trombino generazione - ETP, nM·min	1285 [1142–1439]
Trombino generazione - Peak thrombin, nM	259 [224–291]

I dati sono espressi come mediana [IQR]. WBC: white blood cells (leucociti); AST: aspartato aminotransferasi; ALT: alanina aminotransferasi; GGT: gamma-glutamyl transferasi; HDL: high-density lipoprotein; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; Ag: antigene; FVIII: fattore VIII; ROTEM: rotational thromboelastometry; INTEM: test ROTEM con attivazione della via intrinseca; EXTEM: test ROTEM con attivazione della via estrinseca; MCF: maximum clot firmness; ETP: endogenous thrombin potential; IQR: intervallo interquartile.

4.2 Confronto tra pazienti con fibrosi F0–F2 e fibrosi avanzata F3–F4

Tra i 587 pazienti per i quali era disponibile la classificazione della fibrosi epatica, 538 presentavano fibrosi F0–F2 e 49 fibrosi avanzata F3–F4 (Tabella V). Le variabili continue sono state espresse come mediana [IQR] e confrontate mediante test di Mann–Whitney, mentre per le variabili categoriche è stato utilizzato il test di Fisher. I pazienti con fibrosi avanzata F3–F4 presentavano un profilo metabolico più compromesso rispetto ai soggetti con fibrosi F0–F2. In particolare, il BMI mediano risultava significativamente più elevato nel gruppo F3–F4 (33 [29–35] rispetto a 29 [26–32] kg/m²; $p<0,001$), così come la circonferenza vita (115 [105–120] rispetto a 101 [93–110] cm; $p<0,001$). Anche la prevalenza di obesità risultava maggiore nei pazienti con fibrosi avanzata (68,8% rispetto a 44,8%; $p=0,002$) (Tabella V). Nel gruppo F3–F4 erano significativamente più frequenti anche l'ipertensione arteriosa (77,6% rispetto a 56,4%; $p=0,004$) e il diabete mellito (53,1% rispetto a 27,6%; $p<0,001$). Non emergevano invece differenze statisticamente significative tra i due gruppi per età, sesso, prevalenza di ASCVD e terapia antiaggregante (Tabella V).

Tabella V. Confronto delle caratteristiche cliniche e metaboliche tra pazienti con fibrosi F0–F2 e F3–F4.

Variabile	F0–F2 (n=538)	F3–F4 (n=49)	p
Età, anni	61 [51–68]	65 [54–69]	0,077
Maschi, n (%)	333 (61,9)	33 (67,3)	0,539
BMI, kg/m ²	29 [26–32]	33 [29–35]	<0,001
Circonferenza vita, cm	101 [93–110]	115 [105–120]	<0,001
Obesità, n/N (%)	235/524 (44,8)	33/48 (68,8)	0,002
Iipertensione, n/N (%)	296/525 (56,4)	38/49 (77,6)	0,004
Diabete, n/N (%)	145/525 (27,6)	26/49 (53,1)	<0,001
ASCVD, n/N (%)	76/517 (14,7)	9/49 (18,4)	0,529
Terapia antiaggregante, n (%)	64 (11,9)	9 (18,4)	0,180

I dati sono espressi come mediana [IQR], n (%) o n/N (%). BMI: body mass index; ASCVD: malattia cardiovascolare aterosclerotica; IQR: intervallo interquartile.

4.2.1 Valutazione dell'emostasi

4.2.1.1 Profilo epatico ed emostatico

I pazienti con fibrosi avanzata F3–F4 presentavano una conta piastrinica significativamente inferiore rispetto ai soggetti con fibrosi F0–F2 (160,5 [127,5–179,5] $\times 10^9/L$ rispetto a 182 [154–211] $\times 10^9/L$; $p < 0,001$). Nello stesso gruppo risultavano significativamente più elevati anche i valori di AST, ALT e GGT (Tabella VI).

Per quanto riguarda il profilo emostatico, nei pazienti con fibrosi avanzata F3–F4 si osservavano valori significativamente inferiori di antigene della proteina C (106 [90,8–131,3] % rispetto a 118,5 [103–137] %; $p = 0,004$) e di attività coagulometrica della proteina C (91 [74,5–106,3] % rispetto a 96 [88–111] %; $p = 0,013$). Anche l'attività cromogenica della proteina C risultava ridotta nei pazienti con fibrosi avanzata, con valori mediani di 120 [102–138,5] % rispetto a 131 [116,8–149] % nei pazienti con fibrosi F0–F2. L'antitrombina era inoltre significativamente ridotta nel gruppo F3–F4 (92,5 [87–99] % rispetto a 103 [94–111] %; $p < 0,001$), mentre non emergevano differenze significative per la proteina S totale (Tabella VI).

Analizzando i fattori procoagulanti, il fibrinogeno risultava significativamente più elevato nel gruppo con fibrosi avanzata (388 [343–454] mg/dL rispetto a 360 [316,5–406,5] mg/dL; $p = 0,023$), così come il fattore VIII (157,5 [126,8–194,8] % rispetto a 139 [109–172] %; $p = 0,004$). La hs-CRP mostrava valori mediani più elevati nei pazienti F3–F4, senza però raggiungere la significatività statistica (Tabella VI).

Tabella VI. Profilo epatico ed emostatico nei pazienti con fibrosi F0–F2 e F3–F4.

Variabile	F0–F2 (n=538)	F3–F4 (n=49)	p
Piastrine, $\times 10^9/L$	182 [154–211]	160,5 [127,5–179,5]	<0,001
AST, U/L	27 [22–35]	37 [27–48]	<0,001
ALT, U/L	30 [21–46]	37,5 [24–69,8]	0,039
GGT, U/L	32 [21–60]	62 [30–124]	<0,001
hs-CRP, mg/L	1,13 [0,61–2,13]	1,55 [0,75–3,42]	0,091
Proteina C antigenica, %	118,5 [103–137]	106 [90,8–131,3]	0,004
Proteina C attività coagulometrica, %	96 [88–111]	91 [74,5–106,3]	0,013
Proteina C attività cromogenica, %	131 [116,8–149]	120 [102–138,5]	0,002
Proteina S totale, %	105 [94–118]	105 [96–119,3]	0,636
Antitrombina, %	103 [94–111]	92,5 [87–99]	<0,001
Fibrinogeno, mg/dL	360 [316,5–406,5]	388 [343–454]	0,023
FVIII, %	139 [109–172]	157,5 [126,8–194,8]	0,004

I dati sono espressi come mediana [IQR]. AST: aspartato aminotransferasi; ALT: alanina aminotransferasi; GGT: gamma-glutamyl transferasi; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; FVIII: fattore VIII; IQR: intervallo interquartile.

4.2.1.2 ROTEM

Alla valutazione ROTEM non emergevano differenze statisticamente significative tra i pazienti con fibrosi F0–F2 e quelli con fibrosi avanzata F3–F4. I valori di INTEM-MCF erano pari a 63 [59,3–66] mm nel gruppo F0–F2 e 62 [58–65] mm nel gruppo F3–F4 ($p=0,300$). Anche EXTEM-MCF non mostrava differenze significative tra i due gruppi, con valori mediani rispettivamente di 65 [62–68] mm e 63 [59–66,3] mm ($p=0,094$). Analogamente, FIBTEM-MCF risultava sovrapponibile, con valori di 16 [14–20] mm nei pazienti F0–F2 e 16,5 [14–20] mm nei pazienti F3–F4 ($p=0,684$) (Tabella VII).

Tabella VII. Risultati ROTEM nei pazienti con fibrosi F0–F2 e F3–F4.

Variabile	F0–F2 (n=538)	F3–F4 (n=49)	p
INTEM-MCF, mm	63 [59,3–66]	62 [58–65]	0,300
EXTEM-MCF, mm	65 [62–68]	63 [59–66,3]	0,094
FIBTEM-MCF, mm	16 [14–20]	16,5 [14–20]	0,684

I dati sono espressi come mediana [IQR]. ROTEM: rotational thromboelastometry; INTEM: test ROTEM con attivazione della via intrinseca; EXTEM: test ROTEM con attivazione della via estrinseca; FIBTEM: test ROTEM con inibizione della componente piastrinica e valutazione prevalente del contributo del fibrinogeno; MCF: maximum clot firmness; IQR: intervallo interquartile.

4.2.1.3 Test di aggregazione piastrinica su sangue intero

Nei test di aggregazione piastrinica su sangue intero non si osservavano differenze statisticamente significative tra i due gruppi. L'aggregazione piastrinica indotta da ADP era pari a 57 [38–75] U nei pazienti F0–F2 e 50 [39–67] U nei pazienti F3–F4 ($p=0,169$). Anche la risposta a TRAP risultava simile nei due gruppi, con valori rispettivamente di 104 [90–122] U e 102 [89,5–113,5] U ($p=0,358$). L'aggregazione indotta dall'acido arachidonico (ASPI) era pari a 55 [35–69] U nei pazienti F0–F2 e 49 [28–61] U nei pazienti F3–F4, senza differenze significative ($p=0,128$) (Tabella VIII).

Tabella VIII. Test di aggregazione piastrinica su sangue intero nei pazienti con fibrosi F0–F2 e F3–F4.

Test piastrinico	F0–F2	F3–F4	p
ADP, U	57 [38–75] (n=497)	50 [39–67] (n=39)	0,169
TRAP, U	104 [90–122] (n=496)	102 [89,5–113,5] (n=39)	0,358
ASPI, U	55 [35–69] (n=497)	49 [28–61] (n=39)	0,128

I dati sono espressi come mediana [IQR]. ADP: adenosina difosfato; TRAP: thrombin receptor-activating peptide; ASPI: test di aggregazione piastrinica indotta da acido arachidonico; U: unità dell'area sotto la curva di aggregazione; IQR: intervallo interquartile.

Test di aggregazione piastrinica dopo esclusione dei pazienti in terapia antiaggregante

Dopo l'esclusione dei pazienti in terapia antiaggregante, l'analisi comprendeva 435 pazienti con fibrosi F0–F2 e 32 con fibrosi F3–F4 per i quali erano disponibili i dati Multiplate. In questa analisi, l'aggregazione piastrinica indotta da ADP risultava significativamente più bassa nei pazienti con fibrosi avanzata, con valori pari a 47,5 [28,5–60,3] U rispetto a 58 [39–75] U nel gruppo F0–F2 ($p=0,012$). Anche l'aggregazione indotta dall'acido arachidonico (ASPI) risultava significativamente ridotta nei pazienti F3–F4, con valori di 50,5 [36,8–61,3] U rispetto a 58 [44–71] U ($p=0,043$). Non emergevano differenze significative per TRAP, con valori di 102 [85,5–110,5] U nel gruppo F3–F4 e 104 [90–122] U nel gruppo F0–F2 ($p=0,145$) (Tabella IX).

Tabella IX. Test di aggregazione piastrinica nei pazienti non in terapia antiaggregante.

Test piastrinico	F0–F2, no antiaggreganti (n=435)	F3–F4, no antiaggreganti (n=32)	p
ADP, U	58 [39–75]	47,5 [28,5–60,3]	0,012
TRAP, U	104 [90–122]	102 [85,5–110,5]	0,145
ASPI, U	58 [44–71]	50,5 [36,8–61,3]	0,043

I dati sono espressi come mediana [IQR]. ADP: adenosina difosfato; TRAP: thrombin receptor-activating peptide; ASPI: test di aggregazione piastrinica indotta da acido arachidonico; U: unità dell'area sotto la curva di aggregazione; IQR: intervallo interquartile.

4.2.1.4 Test di generazione di trombina

In assenza di trombomodulina (TM), l'ETP non mostrava differenze significative tra i due gruppi. Nei pazienti con fibrosi F3–F4 il lag time risultava significativamente più lungo (5,73 [5,00–6,37] rispetto a 5,33 [4,92–6,00] min; $p=0,035$), mentre il Velocity Index era significativamente più elevato (110,2 [92,9–119,4] rispetto a 94,5 [73,2–117,8] nM/min; $p=0,009$). Il peak thrombin risultava maggiore nel gruppo con fibrosi avanzata, senza però raggiungere la significatività statistica (Tabella X).

In presenza di trombomodulina, nei pazienti F3–F4 risultavano significativamente più elevati l’ETP+TM, il peak thrombin+TM, il Velocity Index+TM e lo StartTail+TM. L’ETP inhibition risultava invece significativamente ridotta nei pazienti con fibrosi avanzata (31,5 [18,9–40,6] % rispetto a 39,3 [24,5–53,1] %; $p=0,003$), mentre l’ETP ratio era significativamente maggiore (0,69 [0,60–0,81] rispetto a 0,61 [0,47–0,76]; $p=0,003$) (Tabella X).

Tabella X. Parametri di generazione di trombina nei pazienti con fibrosi F0–F2 e F3–F4.

Parametro TG	F0–F2	F3–F4	p
Senza trombomodulina			
Lag time, min	5,33 [4,92–6,00]	5,73 [5,00–6,37]	0,035
ETP, nM·min	1284,9 [1149,4–1437,0]	1315,1 [1119,5–1476,8]	0,449
Peak thrombin, nM	258,8 [223,6–290,5]	272,4 [244,3–300,6]	0,070
ttPeak, min	8,24 [7,50–9,14]	8,33 [7,67–9,00]	0,554
Velocity Index, nM/min	94,5 [73,2–117,8]	110,2 [92,9–119,4]	0,009
StartTail, min	23,50 [22,33–24,83]	24,00 [22,96–25,66]	0,115
Con trombomodulina			
Lag time + TM, min	6,67 [5,96–7,67]	7,00 [6,13–8,00]	0,084
ETP + TM, nM·min	769,9 [589,3–976,2]	952,0 [761,8–1100,8]	0,002
Peak + TM, nM	179,4 [134,2–240,6]	218,1 [176,8–254,2]	0,006
ttPeak + TM, min	9,00 [8,21–10,17]	9,24 [8,46–10,21]	0,196
Velocity Index + TM, nM/min	76,5 [54,2–109,2]	95,3 [75,7–117,3]	0,010
StartTail + TM, min	22,83 [21,83–23,83]	23,59 [22,46–24,83]	0,005
ETP inhibition, %	39,3 [24,5–53,1]	31,5 [18,9–40,6]	0,003
ETP ratio	0,61 [0,47–0,76]	0,69 [0,60–0,81]	0,003

I dati sono espressi come mediana [IQR]. TG: thrombin generation; ETP: endogenous thrombin potential; TM: trombomodulina; ttPeak: time to peak; Velocity Index: velocità di generazione della trombina; StartTail: tempo di esaurimento della generazione di trombina; ETP inhibition: percentuale di inibizione dell’ETP in presenza di trombomodulina; ETP ratio: rapporto tra ETP con trombomodulina ed ETP senza trombomodulina; IQR: intervallo interquartile.

4.2.2 Outcome vascolari secondo la gravità della fibrosi

Per quanto riguarda gli outcome vascolari, non emergevano differenze statisticamente significative tra i pazienti con fibrosi F0–F2 e quelli con fibrosi avanzata F3–F4 per indice caviglia-braccio, prevalenza di ABI patologico, presenza di placche agli arti inferiori, IMT carotideo destro e sinistro e diametro dell'aorta addominale (Tabella XI). La presenza di placca carotidea sinistra risultava invece significativamente più frequente nei pazienti con fibrosi F3–F4 rispetto al gruppo F0–F2 (43,5% rispetto a 28,1%; $p=0,041$). La prevalenza di qualsiasi placca carotidea e di qualsiasi placca aterosclerotica era anch'essa maggiore nei pazienti con fibrosi avanzata, ma senza raggiungere la significatività statistica (Tabella XI).

Tabella XI. Outcome vascolari secondo la gravità della fibrosi.

Outcome vascolare	F0–F2 (n=538)	F3–F4 (n=49)	p
Indice caviglia-braccio (ABI)	1,10 [1,00–1,17] (n=528)	1,08 [1,00–1,12] (n=47)	0,114
ABI patologico (<0,90), n (%)	16/528 (3,0%)	0/47 (0%)	0,632
Placca carotidea destra, n (%)	150/526 (28,5%)	18/46 (39,1%)	0,132
Placca carotidea sinistra, n (%)	148/526 (28,1%)	20/46 (43,5%)	0,041
Qualsiasi placca carotidea, n (%)	182/526 (34,6%)	21/46 (45,7%)	0,149
Placca aterosclerotica agli arti inferiori, n (%)	25/538 (4,6%)	3/49 (6,1%)	0,721
Qualsiasi placca aterosclerotica, n (%)	189/526 (35,9%)	22/46 (47,8%)	0,114
IMT carotide comune destra, mm	1,10 [1,00–1,30]	1,00 [1,00–1,20]	0,862
IMT carotide comune sinistra, mm	1,10 [0,90–1,30]	1,15 [1,00–1,35]	0,413
Diametro dell'aorta addominale, mm	18 [16–20] (n=525)	19 [17–20] (n=45)	0,237

I dati sono espressi come mediana [IQR] o n/N. ABI: ankle-brachial index; IMT: intima-media thickness; qualsiasi placca aterosclerotica: presenza di almeno una placca a livello della carotide destra e/o sinistra e/o del distretto arterioso degli arti inferiori. IQR: intervallo interquartile.

4.3 Analisi di associazione tra severità della fibrosi e profilo emostatico

4.3.1 Associazione tra stiffness epatica e parametri emostatici

Per valutare l'associazione tra la gravità della malattia epatica e il profilo emostatico indipendentemente dalla categorizzazione in stadi di fibrosi, sono state esplorate le correlazioni tra Liver Stiffness Measurement (LSM) e i principali parametri emostatici mediante coefficiente di correlazione di Spearman.

Valori crescenti di LSM risultavano associati a un progressivo incremento del FVIII ($\rho=0,099$; $p=0,016$) e a una riduzione dell'antitrombina ($\rho=-0,196$; $p<0,001$) e dell'attività coagulometrica della proteina C ($\rho=-0,088$; $p=0,032$). Una correlazione inversa significativa emergeva inoltre tra LSM e conta piastrinica ($\rho=-0,107$; $p=0,009$) (Tabella XII).

Per quanto riguarda la trombino-generazione, le associazioni più rilevanti emergevano in presenza di TM. L'aumento della LSM correlava positivamente con ETP+TM ($\rho=0,084$; $p=0,042$), peak thrombin+TM ($\rho=0,087$; $p=0,036$) ed ETP ratio ($\rho=0,101$; $p=0,015$), mentre mostrava una correlazione inversa con ETP inhibition ($\rho=-0,101$; $p=0,014$) (Tabella XII). Non emergevano invece correlazioni significative tra LSM e aggregazione piastrinica indotta da ADP, ASPI o TRAP.

Nel complesso, sebbene le correlazioni osservate fossero di modesta entità, questi risultati suggeriscono che l'incremento della stiffness epatica si associ progressivamente a una riduzione delle componenti anticoagulanti e a una minore risposta anticoagulante alla TM.

Tabella XII. Associazione tra stiffness epatica e parametri emostatici

Parametro	ρ di Spearman	p
Piastrine	-0,107	0,009
FVIII	+0,099	0,016
Proteina C attività	-0,088	0,032
Antitrombina	-0,196	<0,001
ETP + TM	+0,084	0,042
Peak + TM	+0,087	0,036
ETP ratio	+0,101	0,015
ETP inhibition	-0,101	0,014

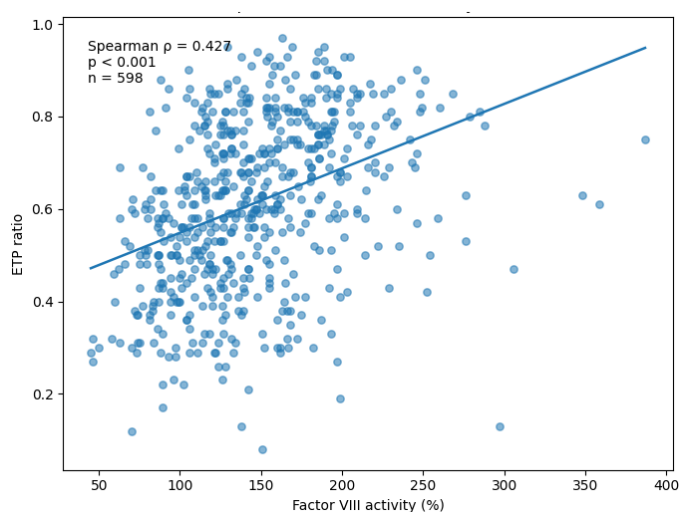
I dati sono espressi come coefficiente di correlazione di Spearman (ρ). FVIII: fattore VIII; ETP: endogenous thrombin potential; TM: trombomodulina; ETP ratio: rapporto tra ETP con trombomodulina ed ETP senza trombomodulina; ETP inhibition: percentuale di inibizione dell'ETP in presenza di trombomodulina.

4.3.2 Relazione tra risposta alla TM e anticoagulanti naturali

È stata successivamente esplorata la relazione tra la risposta anticoagulante alla trombomodulina e i principali determinanti del profilo emostatico. L'ETP ratio mostrava una correlazione positiva di moderata entità con i livelli di FVIII ($\rho=0,427$; $p<0,001$) (figura 3) e correlazioni inverse con l'attività della proteina C ($\rho=-0,388$; $p<0,001$) (figura 4), l'antigene della proteina C ($\rho=-0,229$; $p<0,001$) e l'antitrombina ($\rho=-0,218$; $p<0,001$).

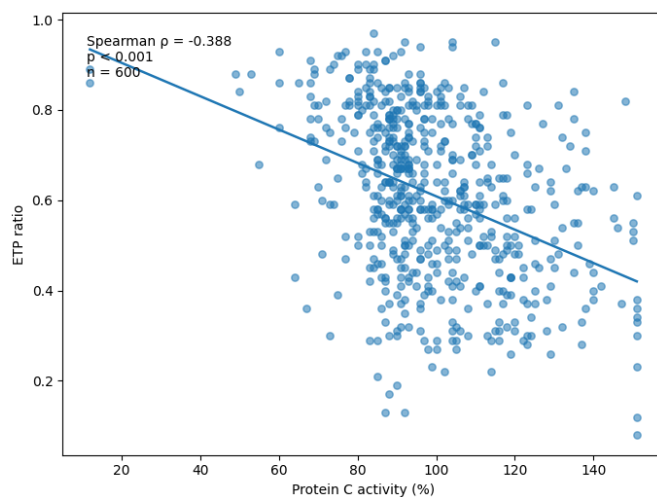
Coerentemente, l'ETP inhibition mostrava una correlazione inversa con il FVIII ($\rho=-0,426$; $p<0,001$) e positiva con l'attività della proteina C ($\rho=0,388$; $p<0,001$). Questi risultati indicano che la ridotta inibizione della generazione di trombina in presenza di trombomodulina si associa a un profilo caratterizzato da livelli più elevati di FVIII e da una riduzione delle componenti anticoagulanti naturali, in particolare della proteina C.

Figura 3. Correlazione tra attività del fattore VIII ed ETP ratio.



È stata osservata una correlazione positiva tra i livelli di attività del fattore VIII (FVIII) e l'ETP ratio (ρ di Spearman = 0,427; $p < 0,001$; $n=598$), indicando una progressiva riduzione dell'inibizione della generazione di trombina in presenza di TM all'aumentare dei livelli di FVIII.

Figura 4. Correlazione tra attività coagulometrica della proteina C ed ETP ratio.



È stata osservata una correlazione inversa tra l'attività coagulometrica della proteina C e l'ETP ratio (ρ di Spearman = -0,388; $p < 0,001$; $n=600$), indicando una maggiore inibizione della generazione di trombina in presenza di trombomodulina all'aumentare dell'attività della proteina C.

4.3.3 Associazione indipendente tra parametri emostatici e fibrosi avanzata

Per valutare se le alterazioni del profilo emostatico fossero associate alla presenza di fibrosi avanzata indipendentemente dai principali fattori clinici e metabolici, sono stati costruiti modelli di regressione logistica multivariata considerando la fibrosi F3–F4 come variabile dipendente. In considerazione del numero relativamente limitato di pazienti con fibrosi avanzata, ciascun parametro emostatico è stato valutato in un modello separato, aggiustato per età, sesso, BMI e diabete mellito. Per consentire un confronto diretto tra parametri misurati su scale differenti, gli odds ratio (OR) sono stati calcolati per incremento di una deviazione standard.

Dopo aggiustamento, livelli più elevati di FVIII rimanevano significativamente associati alla presenza di fibrosi avanzata (OR 1,39; IC95% 1,05–1,84; $p=0,022$), mentre livelli più elevati di antitrombina mostravano un'associazione inversa (OR 0,53; IC95% 0,39–0,72; $p<0,001$). Un'associazione inversa emergeva anche per l'antigene della proteina C (OR 0,65; IC95% 0,48–0,89; $p=0,007$), mentre l'attività coagulometrica della proteina C mostrava un'associazione borderline (OR 0,75; IC95% 0,55–1,01; $p=0,057$) (Tabella XIII).

Tra i parametri di generazione di trombina, ETP+TM mostrava una significativa associazione positiva con la fibrosi avanzata (OR 1,63; IC95% 1,21–2,18; $p=0,001$). Analogamente, valori più elevati di ETP ratio erano associati a una maggiore probabilità di fibrosi F3–F4 (OR 1,55; IC95% 1,11–2,15; $p=0,009$), mentre una maggiore ETP inhibition mostrava un'associazione inversa (OR 0,65; IC95% 0,47–0,90; $p=0,010$). Il fibrinogeno non manteneva invece un'associazione statisticamente significativa dopo aggiustamento (OR 1,27; IC95% 0,95–1,70; $p=0,107$). (Tabella XIII).

Nel complesso, questi risultati indicano che le alterazioni del profilo emostatico, e in particolare la ridotta risposta anticoagulante alla TM, rimangono associate alla fibrosi avanzata anche dopo aggiustamento per i principali fattori clinici e metabolici.

Tabella XIII. Associazione tra parametri emostatici e fibrosi avanzata

Parametro	OR aggiustato	IC95%	p
FVIII	1,39	1,05–1,84	0,022
Proteina C antigene	0,65	0,48–0,89	0,007
Proteina C attività	0,75	0,55–1,01	0,057
Antitrombina	0,53	0,39–0,72	<0,001
Fibrinogeno	1,27	0,95–1,70	0,107
ETP + TM	1,63	1,21–2,18	0,001
ETP ratio	1,55	1,11–2,15	0,009
ETP inhibition	0,65	0,47–0,90	0,010

OR calcolati per incremento di 1 deviazione standard. Ciascun parametro emostatico è stato analizzato in un modello separato aggiustato per età, sesso, BMI e diabete mellito. OR: odds ratio; IC95%: intervallo di confidenza al 95%; BMI: body mass index; FVIII: fattore VIII; ETP: endogenous thrombin potential; TM: trombomodulina; ETP ratio: rapporto tra ETP con trombomodulina ed ETP senza trombomodulina; ETP inhibition: percentuale di inibizione dell'ETP in presenza di trombomodulina.

5 DISCUSSIONE

5.1 Profilo clinico, metabolico e infiammatorio

Nella nostra coorte, la fibrosi avanzata si associava a un profilo cardiometabolico più compromesso, caratterizzato da maggiore adiposità e da una prevalenza elevata di diabete e ipertensione. Le alterazioni emostatiche e vascolari osservate devono quindi essere interpretate considerando le differenze cliniche e metaboliche tra i gruppi, che rendono difficile isolare il contributo della fibrosi epatica. L'aggiustamento per età, sesso, BMI e diabete ha consentito di valutare le associazioni emostatiche tenendo conto di alcuni di questi fattori, pur senza escludere un possibile confondimento residuo. Per gli outcome vascolari, l'assenza di analisi multivariabili richiede maggiore cautela: le differenze a livello carotideo potrebbero riflettere, almeno in parte, il maggiore carico cardiometabolico dei pazienti con fibrosi avanzata. A questo profilo non si accompagnava una differenza statisticamente significativa della hs-CRP. I risultati non forniscono quindi un'evidenza di maggiore infiammazione sistemica rilevabile attraverso questo marcatore nei pazienti F3–F4, ma non consentono di escludere il coinvolgimento di processi infiammatori nelle associazioni osservate.

5.2 Alterazioni del profilo emostatico

5.2.1 Anticoagulanti naturali e fattori procoagulanti

L'associazione della fibrosi avanzata con valori inferiori di proteina C e antitrombina e superiori di FVIII suggerisce un possibile spostamento dell'equilibrio emostatico plasmatico in senso procoagulante. La riduzione della proteina C interessava sia la concentrazione antigenica sia l'attività, mentre la proteina S non mostrava differenze significative. Le modificazioni, quindi, non coinvolgevano uniformemente tutti gli anticoagulanti naturali misurati. Il quadro osservato è coerente con quanto descritto in letteratura da Tripodi et al., che hanno riscontrato una riduzione della proteina C e dell'antitrombina soprattutto nella cirrosi metabolica, con una maggiore conservazione nelle forme non cirrotiche (60). Le associazioni dell'antitrombina e dell'antigene della proteina C con la fibrosi avanzata persistevano anche dopo l'aggiustamento per età, sesso, BMI e diabete, suggerendo che la severità della fibrosi potesse contribuire alle variazioni osservate anche tenendo conto delle principali caratteristiche cliniche e metaboliche. Per

l'attività coagulometrica della proteina C, invece, l'associazione aggiustata non raggiungeva la significatività statistica. Le correlazioni inverse degli anticoagulanti naturali con la LSM, seppur di modesta entità, sostengono la coerenza dei risultati. Nella stessa direzione si colloca lo studio di Valenti et al., condotto in soggetti con fattori di rischio metabolico, nel quale una maggiore stiffness epatica era associata a minore attività della proteina C e a un rapporto FVIII/proteina C più elevato, anche dopo aggiustamento (61).

Sul versante procoagulante, anche l'associazione tra livelli più elevati di FVIII e fibrosi avanzata rimaneva significativa dopo aggiustamento. Il FVIII mostrava inoltre una correlazione positiva, seppur debole, con la LSM. Questi risultati sono coerenti con quanto descritto da Tripodi et al. nella NASH e nella cirrosi metabolica (60) e da Lombardi et al. in pazienti con MASLD e diabete (62). Nel complesso, l'aumento del FVIII e la concomitante riduzione degli anticoagulanti naturali sostengono l'interpretazione di uno squilibrio emostatico plasmatico in senso procoagulante.

Per il fibrinogeno, l'evidenza è meno consistente: i livelli erano significativamente più elevati nei pazienti F3–F4, ma l'associazione con la fibrosi avanzata non raggiungeva la significatività nel modello aggiustato. Questo risultato può essere confrontato con quello di Verrijken et al., che hanno ricondotto le variazioni del fibrinogeno soprattutto alle caratteristiche metaboliche della popolazione, senza riscontrare un'associazione indipendente con la severità istologica epatica (81). Anche nella nostra coorte, quindi, il profilo metabolico più compromesso dei pazienti F3–F4 potrebbe contribuire alla differenza osservata, pur senza poterlo dimostrare con le analisi disponibili. L'associazione con la fibrosi appare pertanto più consistente per antitrombina, antigene della proteina C e FVIII; il significato funzionale di questo profilo viene approfondito dai test di generazione della trombina.

5.2.2 Generazione di trombina e risposta alla trombomodulina

Nel presente studio, la fibrosi avanzata si associava soprattutto a una minore risposta anticoagulante alla trombomodulina (TM). In assenza di TM, le differenze riguardavano alcuni parametri cinetici (lag time più lungo e Velocity Index più elevato) senza un aumento significativo dell'ETP. L'alterazione emergeva più chiaramente quando il test veniva eseguito in presenza di TM, la quale, legandosi alla trombina, favorisce l'attivazione della proteina C e la conseguente inattivazione dei fattori Va e VIIIa (52). Nei pazienti F3–F4, l'ETP+TM era più elevato rispetto ai pazienti F0–F2, indicando una maggiore generazione complessiva di trombina in presenza di TM. L'ETP inhibition, che esprime la riduzione percentuale dell'ETP dopo l'aggiunta di TM, era invece inferiore (31,5% rispetto al 39,3%). Coerentemente, l'ETP ratio, definito come rapporto tra ETP con e senza TM, era più elevato. La minore ETP inhibition e il maggiore ETP ratio descrivono quindi lo stesso fenomeno: nei pazienti con fibrosi avanzata, la TM inibiva meno la generazione di trombina.

Le correlazioni con i singoli fattori emostatici possono aiutare a interpretare la minore risposta alla TM. Un ETP ratio più elevato, indicativo di una minore inibizione della generazione di trombina, si associava a livelli maggiori di FVIII e a valori inferiori di attività coagulometrica della proteina C, antigene della proteina C e antitrombina. Le correlazioni più forti riguardavano il FVIII e l'attività coagulometrica della proteina C. La ridotta risposta alla TM era quindi associata sia all'aumento di un fattore procoagulante sia alla riduzione degli anticoagulanti naturali.

La ridotta risposta alla TM osservata nel nostro studio è coerente con i risultati di Tripodi et al., che hanno documentato un ETP ratio crescente con la severità della NAFLD, con valori più elevati nella cirrosi metabolica (60). Una concordanza parziale emerge dal confronto con Potze et al.: nei pazienti cirrotici gli autori hanno rilevato una minore sensibilità alla TM, ma un ETP+TM comparabile a quello dei controlli (56). Nella nostra coorte, invece, la minore risposta alla TM nei pazienti F3–F4 si accompagnava anche a un ETP+TM più elevato rispetto ai pazienti F0–F2. Pur considerando i diversi gruppi di riferimento, i nostri dati documentano

quindi sia una minore inibizione della generazione di trombina sia un maggiore potenziale trombinico in presenza di TM.

Considerando la LSM come variabile continua, valori più elevati di stiffness correlavano con un aumento di ETP+TM, peak thrombin+TM ed ETP ratio e con una riduzione dell'ETP inhibition. Le correlazioni erano di modesta entità, ma la loro direzione era coerente con le differenze osservate tra i gruppi. L'associazione tra maggiore LSM ed ETP ratio più elevato trova riscontro anche nello studio di Lombardi et al., condotto in pazienti con MASLD e diabete (62).

Nei modelli di regressione logistica multivariata, ETP+TM ed ETP ratio rimanevano positivamente associati alla fibrosi avanzata dopo aggiustamento per età, sesso, BMI e diabete, con l'ETP inhibition che manteneva un'associazione inversa. La relazione tra fibrosi avanzata e minore risposta anticoagulante era quindi presente anche tenendo conto di queste caratteristiche cliniche e metaboliche.

Nel complesso, le differenze emerse soprattutto in presenza di TM suggeriscono una compromissione della regolazione anticoagulante della generazione di trombina nella fibrosi avanzata.

5.2.3 Piastrine e ROTEM

La minore conta piastrinica nei pazienti F3–F4 e la sua debole correlazione inversa con la LSM indicano un'associazione tra maggiore severità della fibrosi e riduzione del numero di piastrine. Il risultato è coerente con quanto riportato da Yoneda et al., che hanno documentato una riduzione della conta piastrinica all'aumentare dello stadio istologico di fibrosi nei pazienti con NAFLD (82).

Sul piano funzionale, l'aggregometria su sangue intero non forniva evidenza di una maggiore aggregazione piastrinica nella fibrosi avanzata. Nell'analisi complessiva, ADP, ASPI e TRAP non differivano significativamente tra i gruppi. Dopo l'esclusione dei pazienti in terapia antiaggregante, emergevano invece risposte inferiori ad ADP e ASPI nei pazienti F3–F4, mentre la risposta al TRAP rimaneva priva di differenze significative. La riduzione non riguardava quindi tutti gli stimoli esaminati e non si accompagnava a correlazioni significative tra i risultati

aggregometrici e la LSM. Questi risultati richiedono di considerare anche la minore conta piastrinica: Hanke et al., modificando sperimentalmente la concentrazione piastrinica in campioni di volontari sani, hanno osservato una riduzione delle risposte al Multiplate a concentrazioni inferiori alla norma, senza differenze significative nell'intervallo normale (83). Nel nostro studio non è quindi possibile stabilire quanto le minori risposte aggregometriche riflettano il numero di piastrine o una diversa reattività. L'interpretazione è inoltre limitata dalla numerosità del sottogruppo F3–F4 senza terapia antiaggregante, composto da 32 pazienti.

Una parziale concordanza emerge dal confronto con Castelli et al., che nei pazienti con MASLD e fibrosi avanzata hanno descritto una ridotta reattività piastrinica alla stimolazione, pur in presenza di marcatori di attivazione in vivo elevati (64). Il risultato deriva tuttavia da test citofluorimetrici con TRAP-6 e non è direttamente sovrapponibile alle minori risposte ADP e ASPI osservate mediante aggregometria nella nostra coorte.

Per quanto riguarda il ROTEM, INTEM-MCF, EXTEM-MCF e FIBTEM-MCF non differivano significativamente tra F0–F2 e F3–F4. Le alterazioni osservate negli altri test non si accompagnavano quindi a differenze significative nella fermezza massima del coagulo.

Nel complesso quindi, la fibrosi avanzata si associava a modificazioni di diversa direzione: da un lato, a una minore conta piastrinica e a una ridotta risposta agli stimoli ADP e ASPI nel sottogruppo non trattato con antiaggreganti; dall'altro, a una riduzione della proteina C e dell'antitrombina, a un aumento del FVIII e del fibrinogeno e a una minore risposta anticoagulante alla trombomodulina. Nel loro insieme, questi risultati descrivono un **“rebalanced hemostatic phenotype associated with advanced fibrosis”**, un quadro caratterizzato da alterazioni contemporanee e in parte opposte dei compartimenti procoagulante e anticoagulante e della funzione piastrinica.

5.3 Danno vascolare subclinico

Nel presente studio, l'associazione tra fibrosi avanzata e danno vascolare subclinico trovava un riscontro parziale. L'unica differenza significativa riguardava la placca carotidea sinistra, più frequente nei pazienti F3–F4 rispetto ai pazienti F0–F2 (43,5% rispetto a 28,1%; $p=0,041$). Anche la placca carotidea destra, la presenza di qualsiasi placca carotidea e di qualsiasi placca aterosclerotica erano numericamente più frequenti nel gruppo F3–F4, ma senza differenze significative. Non emergevano differenze significative neppure nell'IMT carotideo destro e sinistro. I risultati sono quindi solo parzialmente concordanti con l'associazione tra fibrosi e aterosclerosi subclinica riportata da Jamalinia et al. (79).

Non emergevano differenze significative neppure per ABI, prevalenza di ABI patologico, placche agli arti inferiori e diametro dell'aorta addominale. La scarsa frequenza delle alterazioni periferiche e il numero limitato di pazienti F3–F4 possono aver ridotto la capacità di rilevare differenze. León-Mengíbar et al. hanno analogamente osservato un'associazione di FIB-4 e NFS con le placche carotidee, ma non femorali (84). Questo confronto è però indiretto, perché riguarda soggetti senza epatopatia nota e una diversa valutazione della fibrosi.

Il maggiore carico di obesità, ipertensione e diabete nei pazienti F3–F4 potrebbe contribuire alla maggiore prevalenza di placche. Anche nello studio di Sinn et al., riferito alla persistenza della NAFLD, l'associazione con lo sviluppo di aterosclerosi carotidea subclinica non rimaneva significativa dopo aggiustamento per i fattori metabolici (71). In assenza di analisi vascolari aggiustate nella nostra coorte, non è possibile stabilire se il dato sulle placche carotidee fosse indipendente dal profilo metabolico.

Nel complesso, le evidenze vascolari risultano meno consistenti rispetto a quelle emostatiche e non documentano un aumento generalizzato del danno vascolare subclinico nella fibrosi avanzata.

5.4 Implicazioni dello studio

I risultati evidenziano l'importanza di considerare insieme i diversi aspetti dell'emostasi nei pazienti con MASLD. Una conta piastrinica più bassa o una minore risposta aggregometrica non sono sufficienti a descrivere l'equilibrio emostatico complessivo, poiché possono coesistere con alterazioni plasmatiche in senso procoagulante. Il test di generazione di trombina con TM può essere utile, nell'ambito della ricerca, per approfondire queste alterazioni e fornire informazioni aggiuntive rispetto alla misurazione senza TM. Il suo significato clinico rimane però da chiarire: i dati dello studio non consentono di utilizzarlo per prevedere il rischio trombotico individuale o orientare la terapia. Un possibile sviluppo del lavoro sarebbe seguire i pazienti nel tempo per verificare se le alterazioni emostatiche osservate si associno alla comparsa di eventi trombotici. Per il danno vascolare, sarebbe invece utile approfondire il confronto tra i gruppi tenendo conto delle differenze di età e dei principali fattori di rischio cardiometabolico, così da valutare meglio l'associazione con la fibrosi.

5.5 Limiti dello studio

Il disegno osservazionale consente di descrivere associazioni, ma non di stabilire un rapporto causale tra la fibrosi epatica e le alterazioni emostatiche o vascolari. Inoltre, l'assenza di dati di follow-up non consente di valutare se il profilo osservato sia associato alla successiva comparsa di eventi trombotici o cardiovascolari.

Il gruppo con fibrosi avanzata era numericamente inferiore rispetto al gruppo F0–F2. Inoltre, non tutti i pazienti disponevano di tutte le misurazioni previste: alcune analisi, in particolare quelle vascolari e quelle relative all'aggregazione piastrinica dopo l'esclusione dei pazienti in terapia antiaggregante, sono state condotte su sottogruppi più piccoli. Questo potrebbe aver ridotto la potenza statistica dello studio e la capacità di rilevare differenze, soprattutto per gli outcome meno frequenti.

La severità della fibrosi è stata definita mediante elastografia transiente, attraverso la misurazione della liver stiffness, e non mediante valutazione istologica. Sebbene questa metodica consenta una stratificazione non invasiva della fibrosi, essa non

rappresenta una misura istologica diretta e può essere influenzata da fattori diversi dalla fibrosi stessa (21).

6 CONCLUSIONI

I risultati del presente studio mostrano che nei pazienti con MASLD la fibrosi avanzata si associa a modificazioni concomitanti di diverse componenti dell'emostasi. Nei pazienti F3–F4 sono stati osservati livelli inferiori di proteina C e antitrombina, livelli più elevati di FVIII e una riduzione della conta piastrinica; alcune di queste associazioni sono rimaste significative anche dopo aggiustamento per età, sesso, BMI e diabete mellito. Particolarmente rilevanti sono risultati i dati della generazione di trombina: in condizioni basali l'ETP è risultato comparabile tra i due gruppi, mentre in presenza di TM sono emerse differenze più nette, con aumento dell'ETP ratio e riduzione dell'ETP inhibition nei pazienti con fibrosi avanzata. Questo dato suggerisce che la maggiore severità della fibrosi si associi soprattutto a una ridotta risposta anticoagulante mediata dal sistema trombomodulina–proteina C. Allo stesso tempo, i parametri ROTEM non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi e l'aggregazione piastrinica è risultata ridotta solo per alcuni agonisti dopo esclusione dei pazienti in terapia antiaggregante. Per quanto riguarda il danno vascolare subclinico, è stata osservata una maggiore prevalenza di placca carotidea sinistra nei pazienti F3–F4, mentre non sono emerse differenze significative per gli altri principali parametri vascolari considerati. Nel complesso, l'analisi condotta ha contribuito a delineare un quadro di emostasi ribilanciata associato alla fibrosi avanzata, caratterizzato dalla coesistenza di alterazioni non uniformi dei compartimenti procoagulanti e anticoagulanti e della funzione piastrinica. Saranno necessari ulteriori studi per confermare questi risultati, chiarire il significato clinico del profilo osservato e valutarne l'eventuale associazione con eventi trombotici e cardiovascolari.

BIBLIOGRAFIA

1. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *J Hepatol.* settembre 2024;81(3):492–542. doi:10.1016/j.jhep.2024.04.031 PubMed PMID: 38851997.
2. Israelsen M, Francque S, Tsochatzis EA, Krag A. Steatotic liver disease. *Lancet.* 2 novembre 2024;404(10464):1761–78. doi:10.1016/S0140-6736(24)01811-7 PubMed PMID: 39488409.
3. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol.* dicembre 2023;79(6):1542–56. doi:10.1016/j.jhep.2023.06.003 PubMed PMID: 37364790.
4. Hsu CL, Loomba R. From NAFLD to MASLD: implications of the new nomenclature for preclinical and clinical research. *Nat Metab.* aprile 2024;6(4):600–2. doi:10.1038/s42255-024-00985-1 PubMed PMID: 38383845; PubMed Central PMCID: PMC11262457.
5. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* luglio 2020;73(1):202–9. doi:10.1016/j.jhep.2020.03.039 PubMed PMID: 32278004.
6. Barritt AS, Yu F, Mospan AR, Newsome PN, Roden M, Morris HL, et al. High Concordance Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease in the TARGET-NASH Real-World Cohort. *Am J Gastroenterol.* 1 agosto 2024;119(8):1624–7. doi:10.14309/ajg.0000000000002796 PubMed PMID: 38587293.
7. Song SJ, Lai JCT, Wong GLH, Wong VWS, Yip TCF. Can we use old NAFLD data under the new MASLD definition? *J Hepatol.* febbraio 2024;80(2):e54–6. doi:10.1016/j.jhep.2023.07.021 PubMed PMID: 37541393.
8. Ratziu V, Boursier J, AFEF Group for the Study of Liver Fibrosis. Confirmatory biomarker diagnostic studies are not needed when transitioning from NAFLD to MASLD. *J Hepatol.* febbraio 2024;80(2):e51–2. doi:10.1016/j.jhep.2023.07.017 PubMed PMID: 37543307.
9. Younossi ZM, Kalligeros M, Henry L. Epidemiology of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Clin Mol Hepatol.* febbraio 2025;31(Suppl):S32–50. doi:10.3350/cmh.2024.0431 PubMed PMID: 39159948; PubMed Central PMCID: PMC11925440.
10. Riazi K, Azhari H, Charette JH, Underwood FE, King JA, Afshar EE, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and

- meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* settembre 2022;7(9):851–61. doi:10.1016/S2468-1253(22)00165-0 PubMed PMID: 35798021.
11. Quek J, Chan KE, Wong ZY, Tan C, Tan B, Lim WH, et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* gennaio 2023;8(1):20–30. doi:10.1016/S2468-1253(22)00317-X PubMed PMID: 36400097.
 12. Younossi ZM, Golabi P, Price JK, Owraangi S, Gundu-Rao N, Satchi R, et al. The Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among Patients With Type 2 Diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* ottobre 2024;22(10):1999-2010.e8. doi:10.1016/j.cgh.2024.03.006 PubMed PMID: 38521116.
 13. Hagström H, Shang Y, Hegmar H, Nasr P. Natural history and progression of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* ottobre 2024;9(10):944–56. doi:10.1016/S2468-1253(24)00193-6 PubMed PMID: 39243773.
 14. Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis in NAFLD/NASH: from pathophysiology towards diagnostic and therapeutic strategies. *Mol Aspects Med.* febbraio 2024;95:101231. doi:10.1016/j.mam.2023.101231 PubMed PMID: 38056058.
 15. Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation.* gennaio 2019;103(1):e1–13. doi:10.1097/TP.0000000000002480 PubMed PMID: 30300287.
 16. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* maggio 2005;115(5):1343–51. doi:10.1172/JCI23621 PubMed PMID: 15864352; PubMed Central PMCID: PMC1087172.
 17. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell.* 13 maggio 2021;184(10):2537–64. doi:10.1016/j.cell.2021.04.015 PubMed PMID: 33989548; PubMed Central PMCID: PMC12168897.
 18. Cheng Z, Chu H, Seki E, Lin R, Yang L. Hepatocyte programmed cell death: the trigger for inflammation and fibrosis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1431921. doi:10.3389/fcell.2024.1431921 PubMed PMID: 39071804; PubMed Central PMCID: PMC11272544.
 19. Schwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* maggio 2020;158(7):1913–28. doi:10.1053/j.gastro.2019.11.311 PubMed PMID: 32044315; PubMed Central PMCID: PMC7682538.

20. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. gennaio 2017;37 Suppl 1:85–9. doi:10.1111/liv.13301 PubMed PMID: 28052629.
21. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis - 2021 update. *J Hepatol*. settembre 2021;75(3):659–89. doi:10.1016/j.jhep.2021.05.025 PubMed PMID: 34166721.
22. Mózes FE, Lee JA, Selvaraj EA, Jayaswal ANA, Trauner M, Boursier J, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive tests for advanced fibrosis in patients with NAFLD: an individual patient data meta-analysis. *Gut*. maggio 2022;71(5):1006–19. doi:10.1136/gutjnl-2021-324243 PubMed PMID: 34001645; PubMed Central PMCID: PMC8995830.
23. Taylor RS, Taylor RJ, Bayliss S, Hagström H, Nasr P, Schattenberg JM, et al. Association Between Fibrosis Stage and Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. maggio 2020;158(6):1611-1625.e12. doi:10.1053/j.gastro.2020.01.043 PubMed PMID: 32027911.
24. Ng CH, Lim WH, Hui Lim GE, Hao Tan DJ, Syn N, Muthiah MD, et al. Mortality Outcomes by Fibrosis Stage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. aprile 2023;21(4):931-939.e5. doi:10.1016/j.cgh.2022.04.014 PubMed PMID: 35513235; PubMed Central PMCID: PMC10792524.
25. Sanyal AJ, Van Natta ML, Clark J, Neuschwander-Tetri BA, Diehl A, Dasarathy S, et al. Prospective Study of Outcomes in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med*. 21 ottobre 2021;385(17):1559–69. doi:10.1056/NEJMoa2029349 PubMed PMID: 34670043; PubMed Central PMCID: PMC8881985.
26. Mantovani A, Csermely A, Petracca G, Beatrice G, Corey KE, Simon TG, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of fatal and non-fatal cardiovascular events: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. novembre 2021;6(11):903–13. doi:10.1016/S2468-1253(21)00308-3 PubMed PMID: 34555346.
27. Ma W, Wu W, Wen W, Xu F, Han D, Lyu J, et al. Association of NAFLD with cardiovascular disease and all-cause mortality: a large-scale prospective cohort study based on UK Biobank. *Ther Adv Chronic Dis*. 20 settembre 2022;13:20406223221122478. doi:10.1177/20406223221122478 PubMed PMID: 36159632; PubMed Central PMCID: PMC9493675.
28. Issa G, Shang Y, Strandberg R, Hagström H, Wester A. Cause-specific mortality in 13,099 patients with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in Sweden. *J Hepatol*. settembre 2025;83(3):643–51. doi:10.1016/j.jhep.2025.03.001 PubMed PMID: 40139508.

29. Alon L, Corica B, Raparelli V, Cangemi R, Basili S, Proietti M, et al. Risk of cardiovascular events in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 6 maggio 2022;29(6):938–46. doi:10.1093/eurjpc/zwab212 PubMed PMID: 34939092.
30. Lv Q, Zhao H. The association of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) with the risk of myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Ann Med.* dicembre 2024;56(1):2306192. doi:10.1080/07853890.2024.2306192 PubMed PMID: 38253023; PubMed Central PMCID: PMC10810647.
31. Mantovani A, Petracca G, Csermely A, Beatrice G, Bonapace S, Rossi A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of new-onset heart failure: an updated meta-analysis of about 11 million individuals. *Gut.* 25 luglio 2022;gutjnl-2022-327672. doi:10.1136/gutjnl-2022-327672 PubMed PMID: 35879047.
32. Kasper P, Martin A, Lang S, Kütting F, Goesser T, Demir M, et al. NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc.* luglio 2021;110(7):921–37. doi:10.1007/s00392-020-01709-7 PubMed PMID: 32696080; PubMed Central PMCID: PMC8238775.
33. Mantovani A, Pernigo M, Bergamini C, Bonapace S, Lipari P, Valbusa F, et al. Heart valve calcification in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* agosto 2015;64(8):879–87. doi:10.1016/j.metabol.2015.04.003 PubMed PMID: 25957758.
34. Zhou BG, Ju SY, Mei YZ, Jiang X, Wang M, Zheng AJ, et al. A systematic review and meta-analysis of cohort studies on the potential association between NAFLD/MAFLD and risk of incident atrial fibrillation. *Front Endocrinol.* 2023;14:1160532. doi:10.3389/fendo.2023.1160532 PubMed PMID: 37476492; PubMed Central PMCID: PMC10355839.
35. Anstee QM, Mantovani A, Tilg H, Targher G. Risk of cardiomyopathy and cardiac arrhythmias in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* luglio 2018;15(7):425–39. doi:10.1038/s41575-018-0010-0 PubMed PMID: 29713021.
36. VanWagner LB, Wilcox JE, Ning H, Lewis CE, Carr JJ, Rinella ME, et al. Longitudinal Association of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease With Changes in Myocardial Structure and Function: The CARDIA Study. *J Am Heart Assoc.* 18 febbraio 2020;9(4):e014279. doi:10.1161/JAHA.119.014279 PubMed PMID: 32067588; PubMed Central PMCID: PMC7070184.
37. Driessen S, Francque SM, Anker SD, Castro Cabezas M, Grobbee DE, Tushuizen ME, et al. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and the heart. *Hepatology.* 1 agosto 2025;82(2):487–503. doi:10.1097/HEP.0000000000000735 PubMed PMID: 38147315; PubMed Central PMCID: PMC12266800.

38. Targher G, Byrne CD, Tilg H. MASLD: a systemic metabolic disorder with cardiovascular and malignant complications. *Gut*. 7 marzo 2024;73(4):691–702. doi:10.1136/gutjnl-2023-330595 PubMed PMID: 38228377.
39. Duell PB, Welty FK, Miller M, Chait A, Hammond G, Ahmad Z, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. giugno 2022;42(6):e168–85. doi:10.1161/ATV.0000000000000153 PubMed PMID: 35418240.
40. Deprince A, Haas JT, Staels B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol Metab*. dicembre 2020;42:101092. doi:10.1016/j.molmet.2020.101092 PubMed PMID: 33010471; PubMed Central PMCID: PMC7600388.
41. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol*. agosto 2016;65(2):425–43. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.005 PubMed PMID: 27091791.
42. Targher G, Byrne CD, Tilg H. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications. *Gut*. settembre 2020;69(9):1691–705. doi:10.1136/gutjnl-2020-320622 PubMed PMID: 32321858.
43. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 20 maggio 2020;152:116–41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025 PubMed PMID: 32156524.
44. Fricker ZP, Pedley A, Massaro JM, Vasan RS, Hoffmann U, Benjamin EJ, et al. Liver Fat Is Associated With Markers of Inflammation and Oxidative Stress in Analysis of Data From the Framingham Heart Study. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. maggio 2019;17(6):1157–1164.e4. doi:10.1016/j.cgh.2018.11.037 PubMed PMID: 30476583; PubMed Central PMCID: PMC6475462.
45. Sonaglioni A, Cerini F, Fagiani V, Nicolosi GL, Rumi MG, Lombardo M, et al. Effect of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) on Left Ventricular Mechanics in Patients Without Overt Cardiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med*. 15 aprile 2025;14(8):2690. doi:10.3390/jcm14082690 PubMed PMID: 40283520; PubMed Central PMCID: PMC12028084.
46. Zhang J, Li L, Lin L, Wu Y, Hu L, Feng Z, et al. Prognostic value of FIB-4 and NFS for cardiovascular events in patients with and without NAFLD. *BMC Public Health*. 12 agosto 2025;25(1):2747. doi:10.1186/s12889-025-23883-x PubMed PMID: 40797198; PubMed Central PMCID: PMC12341116.

47. Simon TG, Roelstraete B, Hagström H, Sundström J, Ludvigsson JF. Non-alcoholic fatty liver disease and incident major adverse cardiovascular events: results from a nationwide histology cohort. *Gut*. settembre 2022;71(9):1867–75. doi:10.1136/gutjnl-2021-325724 PubMed PMID: 34489307.
48. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. maggio 2015;61(5):1547–54. doi:10.1002/hep.27368 PubMed PMID: 25125077.
49. Swan D, Lisman T, Tripodi A, Thachil J. The prothrombotic tendency of metabolic-associated fatty liver disease. *J Thromb Haemost JTH*. novembre 2023;21(11):3045–55. doi:10.1016/j.jtha.2023.06.017 PubMed PMID: 37353082.
50. Lisman T, Hernandez-Gea V, Magnusson M, Roberts L, Stanworth S, Thachil J, et al. The concept of rebalanced hemostasis in patients with liver disease: Communication from the ISTH SSC working group on hemostatic management of patients with liver disease. *J Thromb Haemost JTH*. aprile 2021;19(4):1116–22. doi:10.1111/jth.15239 PubMed PMID: 33792172; PubMed Central PMCID: PMC8252070.
51. Lisman T, Caldwell SH, Intagliata NM. Haemostatic alterations and management of haemostasis in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. giugno 2022;76(6):1291–305. doi:10.1016/j.jhep.2021.11.004 PubMed PMID: 35589251.
52. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med*. 14 luglio 2011;365(2):147–56. doi:10.1056/NEJMra1011170 PubMed PMID: 21751907.
53. Senzolo M, Burra P, Cholongitas E, Burroughs A. New insights into the coagulopathy of liver disease and liver transplantation. *World J Gastroenterol WJG*. 28 dicembre 2006;12(48):7725–36. doi:10.3748/wjg.v12.i48.7725 PubMed PMID: 17203512; PubMed Central PMCID: PMC4087534.
54. Islam R, Kundu S, Jha SB, Rivera AP, Flores Monar GV, Islam H, et al. Cirrhosis and Coagulopathy: Mechanisms of Hemostasis Changes in Liver Failure and Their Management. *Cureus*. 14(4):e23785. doi:10.7759/cureus.23785 PubMed PMID: 35518552; PubMed Central PMCID: PMC9063731.
55. Lisman T, Porte RJ. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood*. 12 agosto 2010;116(6):878–85. doi:10.1182/blood-2010-02-261891 PubMed PMID: 20400681.
56. Potze W, Siddiqui MS, Boyett SL, Adelmeijer J, Daita K, Sanyal AJ, et al. Preserved hemostatic status in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. novembre 2016;65(5):980–7. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.001 PubMed PMID: 27302378.

57. Bocatonda A, Del Cane L, Marola L, D'Ardes D, Lessiani G, di Gregorio N, et al. Platelet, Antiplatelet Therapy and Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: A Narrative Review. *Life*. 4 aprile 2024;14(4):473. doi:10.3390/life14040473 PubMed PMID: 38672744; PubMed Central PMCID: PMC11051088.
58. Eriksen PL, Thomsen KL, Sørensen M, Vilstrup H, Hvas AM. Impaired fibrinolysis without hypercoagulability characterises patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Thromb Res*. maggio 2022;213:9–15. doi:10.1016/j.thromres.2022.02.023 PubMed PMID: 35256195.
59. Ye B, Xu C. Systemic metabolic dysfunction drives platelet-mediated inflammation, fibrogenesis, and hepatocarcinogenesis in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Clin Mol Hepatol*. luglio 2026;32(3):1158–85. doi:10.3350/cmh.2026.0218 PubMed PMID: 42107887; PubMed Central PMCID: PMC13430363.
60. Tripodi A, Fracanzani AL, Primignani M, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM, et al. Procoagulant imbalance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. luglio 2014;61(1):148–54. doi:10.1016/j.jhep.2014.03.013 PubMed PMID: 24657400.
61. Valenti L, Tripodi A, La Mura V, Pelusi S, Bianco C, Scalabrino E, et al. Clinical and genetic determinants of the fatty liver-coagulation balance interplay in individuals with metabolic dysfunction. *JHEP Rep Innov Hepatol*. dicembre 2022;4(12):100598. doi:10.1016/j.jhepr.2022.100598 PubMed PMID: 36313186; PubMed Central PMCID: PMC9597122.
62. Lombardi R, Forlano R, Maffi G, Cespiati A, Cinque F, Bignamini D, et al. Procoagulant imbalance is associated with hepatic and vascular complications in patients with MASLD and diabetes. Key role of factor VIII. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. agosto 2025;57(8):1662–8. doi:10.1016/j.dld.2025.05.011 PubMed PMID: 40541512.
63. Li Q, Ruan Y, Zhu Y, Cai Y, Wu K, Shen C, et al. An updated systematic review and meta-analysis: correlation between circulating plasminogen activator inhibitor-1 levels and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *BMC Gastroenterol*. 20 agosto 2025;25(1):604. doi:10.1186/s12876-025-04148-8 PubMed PMID: 40836207; PubMed Central PMCID: PMC12366190.
64. Castelli M, Zoncapè M, Meneguzzi A, Mantovani A, Sacerdoti D, Minuz P, et al. Platelet Functional Profile Is Altered in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. agosto 2025;45(8):e70231. doi:10.1111/liv.70231 PubMed PMID: 40719417; PubMed Central PMCID: PMC12302667.
65. Scharf RE. Thrombocytopenia and Hemostatic Changes in Acute and Chronic Liver Disease: Pathophysiology, Clinical and Laboratory Features, and Management. *J Clin Med*. 6 aprile 2021;10(7):1530.

- doi:10.3390/jcm10071530 PubMed PMID: 33917431; PubMed Central PMCID: PMC8038677.
66. Oni ET, Agatston AS, Blaha MJ, Fialkow J, Cury R, Sposito A, et al. A systematic review: burden and severity of subclinical cardiovascular disease among those with nonalcoholic fatty liver; should we care? *Atherosclerosis*. ottobre 2013;230(2):258–67. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.052 PubMed PMID: 24075754.
 67. Zhou YY, Zhou XD, Wu SJ, Fan DH, Van Poucke S, Chen YP, et al. Nonalcoholic fatty liver disease contributes to subclinical atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Commun*. aprile 2018;2(4):376–92. doi:10.1002/hep4.1155 PubMed PMID: 29619417; PubMed Central PMCID: PMC5880194.
 68. Zheng H, Sechi LA, Navarese EP, Casu G, Vidili G. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and cardiovascular risk: a comprehensive review. *Cardiovasc Diabetol*. 28 settembre 2024;23(1):346. doi:10.1186/s12933-024-02434-5 PubMed PMID: 39342178; PubMed Central PMCID: PMC11439309.
 69. Khoshbaten M, Maleki SH, Hadad S, Baral A, Rocha AV, Poudel L, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease and carotid media-intima thickness: A systematic review and a meta-analysis. *Health Sci Rep*. settembre 2023;6(9):e1554. doi:10.1002/hsr2.1554 PubMed PMID: 37701352; PubMed Central PMCID: PMC10493365.
 70. Wong MYZ, Yap JYL, Sultana R, Cheah M, Goh GBB, Yeo KK. Association between non-alcoholic fatty liver disease and subclinical atherosclerosis in Western and Asian cohorts: an updated meta-analysis. *Open Heart*. dicembre 2021;8(2):e001850. doi:10.1136/openhrt-2021-001850 PubMed PMID: 34933963; PubMed Central PMCID: PMC8693165.
 71. Sinn DH, Cho SJ, Gu S, Seong D, Kang D, Kim H, et al. Persistent Nonalcoholic Fatty Liver Disease Increases Risk for Carotid Atherosclerosis. *Gastroenterology*. settembre 2016;151(3):481–488.e1. doi:10.1053/j.gastro.2016.06.001 PubMed PMID: 27283259.
 72. Gornik HL, Aronow HD, Goodney PP, Arya S, Brewster LP, Byrd L, et al. 2024 ACC/AHA/AACVPR/APMA/ABC/SCAI/SVM/SVN/SVS/SIR/VESS Guideline for the Management of Lower Extremity Peripheral Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 11 giugno 2024;149(24):e1313–410. doi:10.1161/CIR.0000000000001251 PubMed PMID: 38743805; PubMed Central PMCID: PMC12782132.
 73. Song XH, Liu B, Lei F, Liu YM, Zhang X, Chen Z, et al. The Association Between Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease and Peripheral Arterial Disease in the Chinese Population. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2023;16:373–84. doi:10.2147/DMSO.S394414 PubMed PMID: 36798909; PubMed Central PMCID: PMC9926992.

74. Zou Y, Li X, Wang C, Wang J, Wang F, Ma L, et al. Association between non-alcoholic fatty liver disease and peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes. *Intern Med J.* ottobre 2017;47(10):1147–53. doi:10.1111/imj.13549 PubMed PMID: 28696562.
75. Cai X, Rospleszcz S, Mensel B, Schminke U, Kühn JP, Aghdassi AA, et al. Association between hepatic fat and subclinical vascular disease burden in the general population. *BMJ Open Gastroenterol.* settembre 2021;8(1):e000709. doi:10.1136/bmjgast-2021-000709 PubMed PMID: 34593525; PubMed Central PMCID: PMC8487174.
76. Jia Y, Li Y, Yu J, Jiang W, Liu Y, Zeng R, et al. Association between metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and abdominal aortic aneurysm. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD.* aprile 2024;34(4):953–62. doi:10.1016/j.numecd.2023.11.004 PubMed PMID: 38161123.
77. Zhang S, Liang H, Liu J, Zhu Y. The association between liver fibrosis markers and carotid atherosclerosis in non-alcoholic fatty liver disease is strongly influenced by age. *BMC Cardiovasc Disord.* 7 aprile 2026;26(1):424. doi:10.1186/s12872-026-05769-x PubMed PMID: 41947068; PubMed Central PMCID: PMC13195875.
78. Liu Y, Wang J, Jin R, Xu Z, Zhao X, Li Y, et al. Associations of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease With Peripheral Artery Disease: Prospective Analysis in the UK Biobank and ARIC Study. *J Am Heart Assoc.* 19 novembre 2024;13(22):e035265. doi:10.1161/JAHA.124.035265 PubMed PMID: 39547959; PubMed Central PMCID: PMC11681420.
79. Jamalinia M, Zare F, Lankarani KB. Systematic review and meta-analysis: Association between liver fibrosis and subclinical atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* agosto 2023;58(4):384–94. doi:10.1111/apt.17617 PubMed PMID: 37345533.
80. Tan ECL, Tai MLS, Chan WK, Mahadeva S. Association between non-alcoholic fatty liver disease evaluated by transient elastography with extracranial carotid atherosclerosis in a multiethnic Asian community. *JGH Open Open Access J Gastroenterol Hepatol.* aprile 2019;3(2):117–25. doi:10.1002/jgh3.12114 PubMed PMID: 31061886; PubMed Central PMCID: PMC6487823.
81. Verrijken A, Francque S, Mertens I, Prawitt J, Caron S, Hubens G, et al. Prothrombotic factors in histologically proven nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* gennaio 2014;59(1):121–9. doi:10.1002/hep.26510 PubMed PMID: 24375485.
82. Yoneda M, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, et al. Platelet count for predicting fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* novembre 2011;46(11):1300–6. doi:10.1007/s00535-011-0436-4 PubMed PMID: 21750883.

83. Hanke AA, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CF, Rahe-Meyer N, et al. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *Eur J Med Res.* 18 maggio 2010;15(5):214–9. doi:10.1186/2047-783x-15-5-214 PubMed PMID: 20562061; PubMed Central PMCID: PMC3352011.
84. León-Mengíbar J, Malagón MM, Bermúdez-López M, Valdivielso JM, Pamplona R, Torres G, et al. Association of estimated liver fibrosis with carotid but not femoral atherosclerotic burden: the ILERVAS cohort. *Front Endocrinol.* 2025;16:1651689. doi:10.3389/fendo.2025.1651689 PubMed PMID: 41567808; PubMed Central PMCID: PMC12816284.