

Sezione di Gastroenterologia, Di.Bi.M.I.S, Policlinico Universitario Paolo
Giaccone di Palermo, Direttore Prof. A. Craxì

**Protocollo di studio a carattere multicentrico nazionale,
approvato da A.I.S.F.**

Titolo dello studio

Studio randomizzato controllato sulla associazione di vitamina D e correzione dello stile di vita versus sola correzione dello stile di vita in pazienti con steatoepatite non alcolica

Proponente e responsabile scientifico

Prof. Antonio Craxì

Sezione di Gastroenterologia, Di.Bi.M.I.S

Policlinico Universitario Paolo Giaccone,

Piazza delle Cliniche 2,

90127 Palermo

Comitato scientifico

¹Antonio Craxì, ¹Salvatore Petta, ²Giulio Marchesini.

¹Sezione di Gastroenterologia, Di.Bi.M.I.S, Piazza delle Cliniche 2, 90127 Palermo

²Dipartimento di Medicina Clinica, "Alma Mater Studiorum," University of Bologna, Italy.

1. **RAZIONALE**

La Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rappresenta un'ampia gamma di disordini caratterizzata dalla presenza a livello epatico di steatosi in soggetti in cui sia stato escluso un significativo consumo di alcolici (1). In tale contesto è possibile distinguere una condizione di semplice steatosi epatica, laddove l'unica alterazione istologica è la presenza di gocce lipidiche negli epatociti, da uno stato di steatoepatite non alcolica (NASH), caratterizzata dalla presenza di danno ed infiammazione epatocellulare con o senza fibrosi epatica (1). La NAFLD è considerata la manifestazione epatica dell'insulino-resistenza (IR), e pertanto è frequentemente associata con altre espressioni cliniche di IR quali la sindrome metabolica, l'obesità, il diabete tipo 2, la dislipidemia e l'ipertensione arteriosa (2). La prevalenza della NAFLD è di circa il 30% nella popolazione generale (3), ed, in considerazione del rapido incremento dei fattori di rischio per sindrome metabolica, la NAFLD rappresenta oggi la causa più comune di malattia di fegato nei paesi occidentali. La rilevanza clinica della NAFLD deriva dal fatto che una non trascurabile proporzione di pazienti (20–30%) sviluppa la NASH, e che quest'ultima può evolvere verso un quadro di cirrosi epatica in circa il 15% dei casi (4-6). Inoltre la NAFLD, ed in modo particolare la NASH, rappresentano un fattore di rischio cardiovascolare indipendente dagli altri ben noti fattori che contribuiscono all'insorgenza di eventi cardiaci e vascolari (7). Allo stato attuale l'obesità, l'IR, lo stress ossidativo, l'azione delle citochine proinfiammatorie, etc., sono stati identificati come i maggiori responsabili della patogenesi della NAFLD, rappresentando quindi potenziali target terapeutici su cui intervenire (1). Tutti tali fattori infatti, sebbene con meccanismi complessi e non completamente noti, attivano in ultima analisi vie di trasduzione abili a promuovere ed amplificare l'IR, l'infiammazione, il danno cellulare, l'apoptosi, la fibrogenesi, favorendo quindi la progressione della malattia di fegato (1).

La correzione dello stile di vita rappresenta l'unico approccio terapeutico raccomandato nei pazienti con NASH (8,9), mentre in atto non vi sono terapie farmacologiche di comprovata efficacia per questa categoria di pazienti. Numerosi studi pilota, che hanno utilizzato farmaci insulino-sensibilizzanti (tiazolidioni (10) o metformina), ed antiossidanti quali la vitamina E

(11), hanno infatti fornito risultati non conclusivi circa l'efficacia di tali sostanze nel determinare un miglioramento clinico ed istologico nei pazienti con NASH (12).

In questa complessa e non completamente esplorata area di ricerca, anche la vitamina D potrebbe avere un ruolo rilevante. Un deficit di vitamina D è stato associato a numerose condizioni patologiche frequentemente osservate nella NAFLD, quali alterazioni cardiovascolari, IR, e diabete (13-18). In modo particolare, negli ultimi 5 anni, numerosi studi osservazionali hanno suggerito una associazione fra inizio del diabete tipo 2 e deficit di vitamina D, proponendo come possibili meccanismi patogenetici, la capacità della vitamina D a stimolare la secrezione di insulina (13), i suoi effetti sulla sensibilità all'insulina (14), e la capacità di determinare variazioni a carico del tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale (15). Un lavoro recente di Targher e colleghi (19) ha inoltre documentato la presenza di bassi livelli di vitamina D in pazienti con NAFLD, identificando, in questo gruppo di pazienti una relazione inversa fra tali livelli e severità della steatosi, dell'infiammazione e della fibrosi epatica. In linea con questi dati il nostro gruppo ha anche riportato una relazione inversa fra livelli di vitamina D e severità della fibrosi epatica in soggetti con epatite cronica da HCV (20). In accordo con quanto finora esposto, recenti dati sperimentali hanno suggerito come la vitamina D, tramite interazione con il suo recettore nucleare (vitamin D receptor – VDR), sia in grado di interferire con la risposta infiammatoria, la funzionalità dei linfociti T e la fibrogenesi (21-24). Pertanto, considerando il legame fra livelli sierici di vitamina D, severità della NAFLD, e fattori di rischio per NAFLD, noi ipotizziamo che la correzione del deficit di vitamina D possa rappresentare un nuovo obiettivo terapeutico nella gestione dei pazienti con NASH.

2. OBIETTIVI

- L'obiettivo primario del presente protocollo di ricerca consiste nel miglioramento istologico della severità della NASH. La definizione del miglioramento istologico richiede il raggiungimento dei tre seguenti criteri: (a) miglioramento nello score istologico NAS di almeno 2 punti, oppure ottenimento di uno score di $NAS < 3$ alla biopsia di controllo eseguita dopo la terapia; (b) miglioramento di almeno un punto nel ballooning epatocellulare, valutato alla biopsia di controllo post-terapia; (c) assenza di peggioramento dello score di fibrosi.
- Obiettivi secondari includono le variazioni nei singoli componenti istologici del NAS score (steatosi, infiammazione lobulare, e ballooning epatocellulare), nella severità della fibrosi, sui livelli di transaminasi, sui parametri antropometrici e metabolici, e sull'IR.
- Miglioramento dello spessore medio-intimale carotideo, della prevalenza di sindrome metabolica e del profilo di rischio cardiovascolare saranno considerati come ulteriori obiettivi dello studio.

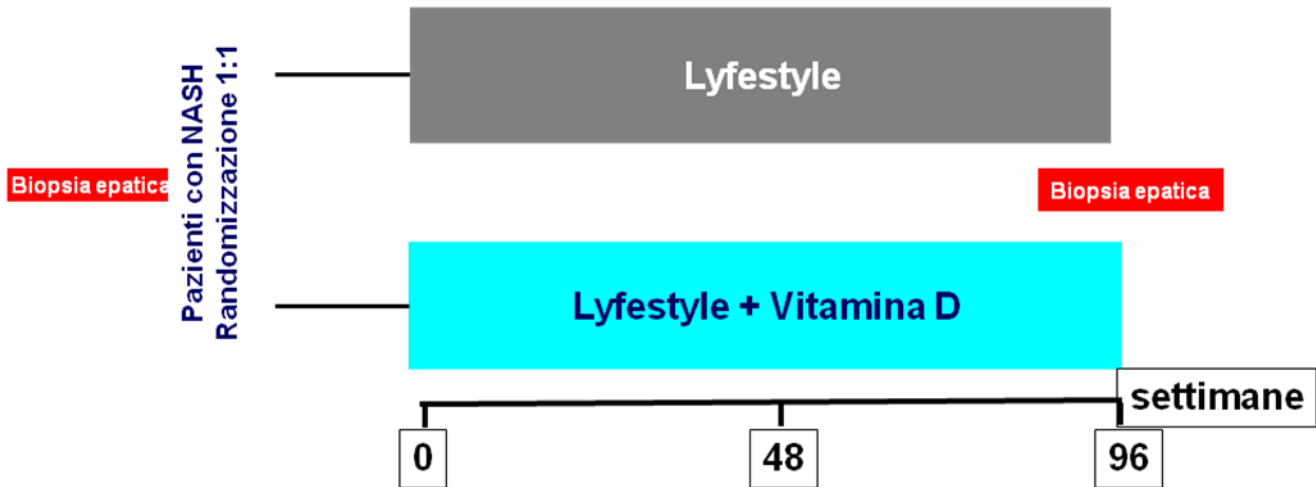
3. DISEGNO DELLO STUDIO

I pazienti con diagnosi istologica di possibile o definita NASH saranno randomizzati 1:1 in ogni centro a ricevere vitamina D più lifestyle counselling (25) per 96 settimane, o solo lifestyle counselling sempre per 96 settimane. Alla fine del trattamento i pazienti saranno nuovamente sottoposti ad una biopsia di controllo.

Nei pazienti del braccio sperimentale, sarà somministrata una dose di colecalciferolo di 20000 IU/week (acquistata dal centro proponente con fondi di ricerca, e distribuita ai centri partecipanti) pari a 80 gocce di Dibase in un pezzo di pane.

Il lifestyle counselling potrà essere attuato secondo due approcci differenti, sulla base della preferenza del paziente e della disponibilità ad usare internet. Il primo approccio, tradizionale, consiste nell'educazione del paziente, ad opera di dietisti e personale qualificato, tramite un manuale predefinito preparato presso l'unità di Malattie Metaboliche e Dietistica Clinica dell'Università di Bologna. Il secondo approccio invece si baserà su una metodica di apprendimento online, basata sullo stesso materiale fornito nel manuale. La piattaforma di apprendimento online sarà accessibile ai pazienti, a cui sarà chiesto di completare le procedure di apprendimento e dei questionari mirati a valutarne la realizzazione. La piattaforma sarà accessibile tramite una password. Ai pazienti sarà inoltre consentito di interagire con gli educatori via e-mail e nei forum, come in una classe virtuale.

Entrambi gli approcci avranno come obiettivo una restrizione calorica tale da indurre una perdita di peso di 0.5 kg/settimana in soggetti sovrappeso o obesi. L'obiettivo finale è raggiungere una perdita di peso $\geq 10\%$. Questo obiettivo può essere ottenuto riducendo l'introito calorico di circa 500 kcal/die. Il counselling dietistico sarà basato su una dieta tipo mediterranea, con limitazioni all'uso di carboidrati raffinati e grassi complessi, esclusione di cibi e bevande arricchite di fruttosio, riduzione della carne rossa, ed implementazione dell'assunzione di proteine vegetali e prodotti ricchi in fibre. Un programma dietistico semistandardizzato sarà anche disponibile on demand. L'attività fisica sarà fortemente incoraggiata, fino ad un livello ottimale di 150 min/settimana di attività a moderata intensità (passeggiata veloce) e 10.000 passi/die su base settimanale.



4. PAZIENTI

Criteri di inclusione

1. Età > 18 anni
2. Diagnosi istologica di possibile o definita NASH, secondo lo score di Kleiner, nei 6 mesi precedenti la randomizzazione.

Criteri di esclusione

1. Consumo medio di alcol superiore a 20 g/die nelle donne e 30 g/die negli uomini per almeno 3 mesi consecutive durante i precedenti 5 anni, valutato mediante un questionario, e confermato dai parenti.
2. Altre cause di malattia cronica di fegato: malattia di Wilson (valori sierici normali di ceruloplasmina); deficit di alpha-1-antitripsina (valori sierici normali di alpha-1-antitripsina); epatiti virali (anti-HCV ed HBsAg negativi); cirrosi biliare primitiva (ANA < 1:160 e AMA negativo); epatite autoimmune (ANA, SMA e LKM < 1:160 ed assenza di alterazioni istologiche compatibili con epatite autoimmune); infezione da HIV (anti-HIV negatività); ipo o ipertiroidismo (TSH normale).
3. Storia di bypass gastrointestinale o di altri interventi bariatrici.
4. Cirrosi epatica in classe B o C di Child-Pugh, e/o carcinoma epatocellulare
5. Calo ponderale 5% nei 6 mesi precedenti

Recente (entro 6 mesi dalla biopsia e dalla visita di screening) o concomitante uso di farmaci ad attività steatogenica (corticosteroidi, amiodarone, methotrexate, tamoxifene, tetracicline, alte dosi di estrogeni (ad eccezione di standard HRT e di terapia con contraccettivi orali), acido valproico)

6. Recente (entro 6 mesi dalla biopsia e dalla visita di screening) variazione nella dose/regime di trattamento con vitamina E, Vitamina C, betaine, s-adenosyl methionine, acido ursodesossicolico, silimarina, fibrati, statine, pentoxyfilline, inibitori del recettore II dell'angiotensina, orlistat, sibutramine. La terapia con farmaci antidiabetici ed insulina sarà consentita, se iniziata da almeno 6 mesi prima dell'arruolamento e mantenuta a dose stabile.
7. Terapia in atto o recente (entro 6 mesi dalla biopsia e dalla visita di screening) con vitamina D o con farmaci in grado di interferire con il metabolismo della vitamina D.
8. Ogni condizione, a giudizio del medico, che può interferire con una corretta partecipazione allo studio.
9. Stato di gravidanza o allattamento.

5. VALUTAZIONE CLINICA E BIOUMORALE

Le caratteristiche cliniche, antropometriche e bioumorali saranno raccolte al momento della biopsia, alla visita di screening e durante le visite di controllo, secondo good clinical practice. L'indice di massa corporea (BMI) sarà calcolato come peso in chilogrammi per l'altezza espressa in metri al quadrato. La circonferenza vita sarà misurata dal punto medio tra il confine inferiore della gabbia toracica e la cresta iliaca. La diagnosi di diabete di tipo 2 sarà basata sulla revisione dei criteri dell' American Diabetes Association. Nei pazienti con una precedente diagnosi di diabete di tipo 2, sarà documentata la terapia con insulina o agenti ipoglicemizzanti orali attuata. La diagnosi di ipertensione arteriosa si baserà sui seguenti criteri: pressione arteriosa sistolica ≥ 130 mm Hg e / o pressione diastolica ≥ 90 mm Hg (misurati almeno tre volte entro 30 minuti in posizione seduta usando uno sfigmomanometro brachiale) o precedente diagnosi di ipertensione arteriosa in trattamento farmacologico. La diagnosi di sindrome metabolica sarà fatta sulla base dei criteri ATPIII. Il fumo e l'assunzione di alcol saranno valutati da una dettagliata indagine sui pazienti e parenti e convalidata da un questionario compilato giorno per giorno per 1 settimana dai pazienti. L'apporto nutrizionale qualitativo e quantitativo sarà valutato per mezzo di un registro dietetico per una settimana. Al momento della biopsia, alla visita di screening e durante le visite di controllo, secondo good clinical practice, dopo un digiuno notturno di 12 ore, saranno prelevati campioni di sangue per determinare i livelli sierici di AST, ALT, gamma-glutamyl transferase (gamma-GT), piastrine, HDL, LDL, totale, trigliceridi, glicemia, insulinemia, NA/K/Ca/P, urea e creatinina. L' Insulino resistenza (IR) sarà valutata mediante lo score di HOMA (28). Il VAI index sarà calcolato come descritto in precedenza (29,30), usando la seguente formula differenziata per sesso:

$$\text{Males: VAI} = \left(\frac{WC}{39.68 + (1.88 \times BMI)} \right) \times \left(\frac{TG}{1.03} \right) \times \left(\frac{1.31}{HDL} \right);$$

$$\text{Females: VAI} = \left(\frac{WC}{36.58 + (1.89 \times BMI)} \right) \times \left(\frac{TG}{0.81} \right) \times \left(\frac{1.52}{HDL} \right);$$

Saranno ovviamente valutati anche l'assetto lipidico, e l'IR mediante lo score di HOMA. Alla visita di screening ed ogni 24 settimane, campioni di plasma saranno prelevati per il dosaggio della vitamina D, che sarà centralizzato presso l'UOC di Gastroenterologia di Palermo (Dir. Prof. A. Craxì) ed eseguita secondo tecnica HPLC. Nelle stesse giornate, verranno prelevati campioni di siero e plasma per dosaggi citochinici. Infine, previo consenso informato, durante la visita di screening, campioni di DNA verranno prelevati per eseguire studi di polimorfismi genetico.

6. VALUTAZIONE STRUMENTALE EPATICA

In tutti i centri partecipanti, dopo una notte di digiuno tutti i pazienti verranno sottoposti ad una ecografia dell'addome superiore. Immediatamente dopo, dove disponibile, verrà effettuata la fibroelastometria epatica, utilizzando l'apparecchio FibroScan™ (Echosens, Parigi, Francia), per misurare la rigidità del fegato. Tali tecniche non invasive della valutazione del danno epatico saranno ripetute anche durante le visite di follow-up. Nello stesso giorno della valutazione basale, e dopo 96 settimane di trattamento, sarà effettuata una biopsia epatica utilizzando un ago tipo Menghini (16 G). Il frammento biotico ottenuto sarà fissato in formalina tamponata e incluso in paraffina. I vetrini saranno codificati e letti da un patologo esperto. Sarà richiesta una lunghezza minima del frammento di 15 mm o la presenza di almeno 10 tratti portalici completi. Le biopsie saranno classificate secondo il punteggio numerico dello score di Kleiner (31). In particolare, l'attività di malattia sarà valutata tramite il NAFLD activity score (NAS score), che è basato su un sistema standardizzato di gradazione della steatosi (in una scala da 0 a 3), dell'infiammazione lobulare (in una scala da 0 a 3), e del ballooning epatocellulare (in una scala da 0 a 2), con scores più elevati suggestivi di una maggiore attività di malattia. Sulla base di tale score, specifico criterio di inclusione sarà una diagnosi di possibile o definita NASH con un NAS score di almeno 5. Sebbene l'eleggibilità allo

studio sarà determinata dal patologo di ogni centro, l'analisi finale sarà basata sulla revisione istologica, ad opera di un unico patologo, delle biopsie pre e post trattamento.

7. VALUTAZIONE DELLO SPESSORE MEDIO-INTIMALE CAROTIDEO

L'aterosclerosi carotidea sarà valutata mediante ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione. Il protocollo prevede: (a) la misurazione dello spessore intima-media (IMT) delle arterie carotidi comuni di destra e sinistra da 10 millimetri al di sotto delle loro biforcazioni fino alle biforcazioni e (b), la scansione della carotide interna destra e sinistra per la diagnosi e il grado della placca (ICA). L'IMT carotideo sarà misurato come la differenza tra la prima interfaccia (lume dell'intima) e la seconda interfaccia (media avventizia) sulla parete della carotide comune. IMT carotideo superiore a 1 mm sarà considerato come un valore di cut-off, dato che è stato associato con un rischio da tre a quattro volte superiore di ictus ischemico. La placca sarà definita come una protrusione nel lume del vaso di almeno 13 mm, misurata dal confine tra lo strato dell'avventizia e della media. La valutazione dell'IMT sarà eseguita al baseline e dopo 48 e 96 settimane di cura, nei centri laddove l'esame sia eseguibile.

8. VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA

Ogni centro dovrà segnalare la presenza di eventi avversi, suggerendo, secondo il sistema WHO di gradazione della tossicità da farmaci, la relazione con la somministrazione di vitamina D:

- 0 Non correlata – assenza di correlazione temporale; disturbi addebitabili ad altri fattori.
- 1 Possibilmente correlata – correlazione temporale poco chiara; altre cause possibili.
- 2 Probabilmente correlata – chiara correlazione temporale, con miglioramento alla sospensione del farmaco, e con disturbi non correlabili allo stato del paziente.
- 3 Correlato – chiara associazione temporale, con conferme da dati di laboratorio o ricomparsa del disturbi alla ripresa del farmaco.

9. SCHEDULA DELLE VISITE

Tutti i tests di laboratorio, incluse anamnesi, esame fisico e raccolta dei segni vitali, saranno eseguiti al baseline (entro 7 giorni dall'inizio della terapia), e durante il trattamento secondo il seguente schema.

SCHEDULE → EVENTS ↓	Baseline	Wks 4	Wks 12,36,60,84	Wks 24,48,72	Wks 96
Medical History	X				
Physical Exam	X	X	X	X	X
Adverse Events	X	X	X	X	X
Haematology: WBC, RBC and Hb, PLT	X		X (only week 12)	X	X
Blood Chemistry: AST/ALT, γ GT, Alk Phosph, Total bilirubin, Albumin, INR or Prothrombin Time, glucose, insulin, Total/HDL/LDL cholesterol, triglycerides	X		X (only week 12)	X	X
Renal function tests: urea, creatinine	X		X (only week 12)	X	X
NA/K/Ca/P	X		X (only week 12)	X	X
Plasma for 1-25- dihydroxyvitamin D	X	X	X (only week 12)	X	X
Ultrasound	X			X (weeks 48)	X
Transient elastography	X			X	X
Liver Biopsy	X				X
IMT Evaluation	X			X (week 48)	X
TSH	X				X
HBsAg	X				
anti-HIV	X				
Anti-HCV	X				
Serum/Plasma storage	X	X	X (only week 12)	X	X
DNA storage	X				

Le visite al di fuori di tale schema possono essere eseguite, qualora ritenute necessarie ed appropriate.

10. ANALISI STATISTICA

Descrizione della raccolta e del management dei dati

I dati di questo trial clinic saranno gestiti secondo le ICH Guideline for Good Clinical Practice. I dati dello studio saranno conservati ed utilizzati database di raccolta dati validati a livello internazionale, e programmati nello specifico per questo studio.

L'accesso al database dello studio clinic sarà ristretto al personale autorizzato dai Coordinatori dello studio. I dati registrati nel database includeranno gli items originalmente riportati nella CRF elettronica fornita dalla Associazione Italiana Studio Fegato, dove il protocollo è stato approvato durante la riunione annuale del 2011.

Definizione delle popolazioni per le analisi

I parametri di efficacia primaria e secondaria saranno analizzati usando analisi per intent-to-treat e per-protocol. Tutti i pazienti saranno inclusi nelle analisi di valutazione della sicurezza. La possibilità di differenti strategie di counseling consentirà un'analisi del valore relativo dei 2 approcci, indipendentemente dal braccio di trattamento assegnato

Campione

La numerosità campionaria per il trial è di 200 pazienti, con uguale allocazione nelle due braccia di trattamento (100 per gruppo). La stima della dimensione campionaria è basata su un confronto binomiale della proporzione di pazienti che raggiungeranno l'outcome primario dopo trattamento con vitamina D rispetto al braccio di controllo. La proporzione di pazienti che raggiungeranno l'outcome primario nel gruppo di controllo è approssimata usando dati di letteratura (8,9,11). Al momento non vi sono dati per stimare la risposta istologica alla vitamina D, per cui abbiamo assunto un vantaggio addizionale di circa il 25%. La dimensione campionaria pertanto è calcolata per individuare una differenza, relativa all'outcome primario, del 25% fra il braccio trattato con vitamina D rispetto al controllo. Il calcolo del campione è ottenuto considerando un 30% di out come primario nel gruppo lyfestile, rispetto ad un 55% nel gruppo vitamina D e lyfestile, usando un test ad una coda con un errore α del 5% ed uno β del 10%. Su tale base il numero di pazienti per gruppo è 77. Aumentando questo numero del 10 di dati mancanti attesi, e del 10% di pazienti che rifiuteranno la seconda biopsia,

abbiamo calcolato sufficiente un numero di 100 pazienti per campione, per un totale di 200 pazienti per il trial.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Dig Liv Dis* 2009.
2. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917–23.
3. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44–52.
4. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865–73.
5. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004;40:820–6.
6. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113–21.
7. Targher G, Marra F, Marchesini G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon?. *Diabetologia*. 2008;51:1947-53.
8. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:121-9.
9. Hickman IE, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004;53:413-419.

10. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A Placebo-Controlled Trial of Pioglitazone in Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *NEJM* 2006;355:22997-2307.
11. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *NEJM* 2010 in press.
12. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Systematic review and meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Hepatology* 2010.
13. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2004;27:2813-2818.
14. Tai K, Need AG, Horowitz M, Chapman IM. Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutrition* 2008;24:279-285.
15. Cheng S, Massaro JM, Fox CS, et al. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes* 2010;59:242-248.
16. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, et al. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1949-1956.
17. Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007;167:1159-1165.
18. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168:1174-1180.
19. Targher G, Bertolini L, Scala L, et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:517-524.
20. Petta S, Cammà C, Scazzone C, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2009 Dec 4.
21. Veldman C, Cantorna M, DeLuca H. Expression of 1, 25 dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000;374:334-338.

22. Willheim M, Thien R, Schrottbauer K, et al. Regulatory effects of 1 α , 25 dihydroxyvitamin D₃ on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3739-3744.
23. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *Q J Med* 2002;95:787-796.
24. von Essen MR, Kongsbak M, Schjerling P, et al. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol.* 2010;11:344-9.
25. Bellentani S, Dalle Grave R, Suppini A, Marchesini G; Fatty Liver Italian Network. Behavior therapy for nonalcoholic fatty liver disease: The need for a multidisciplinary approach. *Hepatology.* 2008;47:746-54.
26. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations 2000 Committee Report. *Diabetes Care* 2000;23:S4–19.
27. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486–2497.
28. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
29. Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, et al; For the AlkaMeSy Study Group. Visceral Adiposity Index (VAI): A Reliable Indicator Of Visceral Fat Function Associated With Cardiometabolic Risk. *Diabetes Care* 2010;33:920-2.
30. Petta S, Amato M, Cabibi D, Cammà C, Di Marco V, Giordano C, et al. Visceral Adiposity Index is Associated with Histological Findings and with High Viral Load in Patients with Chronic Hepatitis C Due to Genotype 1. *Hepatology* 2010 in press.
31. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:313-321.

Allegato A
FOGLIO DI INFORMAZIONE PER IL PAZIENTE

Studio randomizzato controllato sulla associazione di vitamina D e correzione dello stile di vita versus sola correzione dello stile di vita in pazienti con steatoepatite non alcolica

Come Le è stato riferito dal suo medico c'è la possibilità che Lei partecipi ad uno studio clinico il cui scopo è quello di verificare se la somministrazione aggiuntiva di colecalciferolo (vitamina D3), in associazione alla terapia comportamentale standard (dieta ed attività fisica), sia in grado di migliorare il danno epatico, in pazienti con diagnosi istologica di possibile o definita steatoepatite non alcolica (NASH).

I dati di letteratura ad oggi disponibili ben documentano come la NASH rappresenti oggi una delle forme più comuni di malattia cronica di fegato, la cui prevalenza, strettamente correlata ad alterazioni metaboliche quali obesità ed insulino-resistenza. L'unica terapia di comprovata efficacia è rappresentata da un'attenta correzione delle abitudini alimentari e dell'attività fisica mirate ad una riduzione del peso corporeo di almeno il 10%. Di contro dati contrastanti esistono relativamente all'uso di farmaci quali antiossidanti ed insulino-sensibilizzanti.

Vi sono numerosi recenti studi che dimostrano come un deficit di vitamina D si associ ad alterazioni metaboliche quali insulino-resistenza, comparsa di diabete, ed alterazioni cardiovascolari. Inoltre un recente lavoro ha mostrato come bassi livelli di vitamina D siano anche correlati alla severità del danno epatico in soggetti con NASH. Infine numerosi modelli sperimentali hanno documentato come la vitamina D, tramite interazione con il suo recettore nucleare, sia in grado di interferire con la risposta immunitaria, l'infiammazione ed i processi di fibrogenesi. Sulla base di tali dati noi ipotizziamo che la supplementazione di vitamina D in pazienti con NASH possa essere utile nel migliorare il danno epatico. Trattandosi di uno studio clinico randomizzato, nel caso Lei decidesse di prendervi parte, potrà essere assegnato al Gruppo di trattamento standard (sola terapia comportamentale) o a quello in cui viene aggiunta la somministrazione della vitamina D3.

Qualora decidesse di partecipare allo studio e venisse assegnato al Gruppo di trattamento standard, lei sarà seguito da personale qualificato in grado di suggerire una giusta correzione dello stile di vita. Qualora venisse assegnato al Gruppo di trattamento con l'associazione di vitamina D3, Lei dovrà assumla, per via orale, in forma di 80 gocce da mettere sul pane, una volta alla settimana, per 96 settimane. Non sono stati descritti effetti collaterali di rilievo con l'utilizzo della vitamina D3 al dosaggio proposto nello studio. Esistono casi di intossicazione da vitamina D per assunzione di dosaggi enormemente più elevati di quelli proposti nello studio e comunque relativi alla forma di vitamina D attiva e non al precursore della vitamina D che invece viene impiegato nello studio. Qualora Lei decidesse di prendere parte allo Studio verrà da parte nostra posta grande attenzione all'eventuale comparsa di effetti collaterali.

Per verificare l'effetto della terapia e l'eventuale comparsa di effetti collaterali, nel corso dello studio, dovrà eseguire periodicamente dei controlli ambulatoriali e dei prelievi di sangue, secondo good clinical practice.

Le verrà inoltre chiesto di eseguire una biopsia epatica dopo le 96 settimane di terapia. Tale procedura sarà importante per valutare se la terapia da Lei praticata ha determinato un miglioramento del danno epatico, fornendo quindi anche importanti informazioni prognostiche.

Nel caso Lei dovesse avvertire durante il trattamento un qualsiasi sintomo nuovo, dovrà consultarsi con il personale medico e paramedico della sua Unità Operativa o con il Responsabile dello studio (Prof. Antonio Craxì, telefono: 091-6552280)

Lei è assolutamente libero di decidere se partecipare o meno allo studio ed ha il diritto di richiedere in ogni momento tutte le informazioni relative alla sua malattia e ai trattamenti previsti dallo studio. Un'eventuale Sua decisione di non partecipare allo studio non avrà alcuna conseguenza sulla qualità dell'assistenza che Le verrà fornita dal personale medico e paramedico. Qualora decidesse di partecipare allo studio Lei avrà il diritto di ritornare su questa decisione e di ritirarsi in qualsiasi momento dallo stesso studio, anche senza dover fornire alcuna motivazione. Ciò non avrà alcuna conseguenza sulla qualità dell'assistenza che Le verrà fornita dal personale medico e paramedico, che continueranno a fornirle tutte le cure del caso.

I dati che La riguardano, in relazione alla Sua partecipazione allo studio, saranno trattati in forma anonima e con la massima discrezionalità dai Ricercatori preposti allo studio.

Studio randomizzato controllato sulla associazione di vitamina D e correzione dello stile di vita versus sola correzione dello stile di vita in pazienti con steatoepatite non alcolica

Il sottoscritto.....(nome e cognome)
dopo aver ricevuto le informazioni relative allo studio,
dopo aver letto il foglio informativo relativo allo studio,
dopo aver posto tutte le domande relative allo studio,
informato circa la volontarietà della partecipazione allo studio,
informato della possibilità di potersi ritirare in qualsiasi momento dallo studio,

acconsente liberamente a partecipare allo studio.

Data:.....

Firma del paziente:..... Firma del Ricercatore:.....

Allegato B

Foglio informativo per il medico di medicina generale

Egr. Collega,

con la presente desideriamo informarti che la/il paziente sig/ra.....è stata/o arruolata/o, previo consenso informato, in uno studio prospettico multicentrico nazionale randomizzato che ha come obiettivo quello di valutare l'impatto della somministrazione orale di coledaliferolo in associazione alla terapia comportamentale standard (dieta ed attività fisica) nell'ottenimento di un miglioramento del danno epatico in pazienti con diagnosi istologica di possibile o definita steatoepatite non alcolica (NASH).

Il protocollo dello studio prevede di randomizzare i pazienti in rapporto 1:1 a ricevere o il trattamento standard basato su una correzione dello stile di vita per 96 settimane o a ricevere, associato alla terapia standard, un trattamento con coledaliferolo al dosaggio di 20.000 UI per os alla settimana per sempre per 96 settimane.

L'end point primario dello studio è rappresentato dal miglioramento del danno epatico, valutato ad una biopsia percutanea epatica di controllo eseguita alla fine della terapia. Obiettivi secondari saranno valutare l'impatto della somministrazione di vitamina D su marcatori surrogati di danno vascolare.

Lo studio prevede l'arruolamento di 100 pazienti per braccio di trattamento, ha un periodo di reclutamento previsto di 18 mesi ed una durata complessiva di 114 mesi.

Tutti i pazienti verranno sottoposti alle consuete valutazioni cliniche e laboratoristiche previste dalla loro condizione patologica e verranno gestiti dal nostro ambulatorio senza oneri aggiuntivi che gravino sul Medico di Medicina Generale.

Lo studio è stato approvato dalla assemblea generale della Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF) ed è stato approvato dal Comitato Etico locale.

Il responsabile scientifico e proponente dello studio è il Prof. Antonio Craxì, Sezione di Gastroenterologia Di.Bi.M.I.S., Policlinico Universitario Paolo Giaccone di Palermo (e-mail: craxanto@unipa.it)

Rimanendo a disposizione, ti invio i miei più cordiali saluti.

Allegato C

Informativa e manifestazione del consenso al trattamento dei dati personali

Il/La sottoscritto/a _____ (*inserire nome e cognome in stampatello*), prende atto di quanto segue:

Titolari del trattamento e relative finalità

Il Centro di sperimentazione _____ (*indicare il nome del centro*) e l'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF), che ha commissionato lo studio che Le è stato descritto, ciascuno per gli ambiti di propria competenza e quindi in qualità di autonomi titolari del trattamento dei Suoi dati, in accordo alle responsabilità previste dalle normative applicabili in materia, tratteranno i Suoi dati personali, in particolare quelli sulla salute e, soltanto nella misura in cui sono indispensabili in relazione all'obiettivo dello studio, altri dati sensibili (quali quelli relativi alla Sua origine, ai Suoi stili di vita, ecc.), esclusivamente in funzione della realizzazione dello studio e a fini di farmacovigilanza.

A tal fine i dati indicati saranno raccolti dal Centro di sperimentazione e trasmessi al Centro Studi AISF e alle persone o società esterne che agiscono per loro conto, ovvero a fornitori di servizi connessi alle finalità di cui sopra.

Il trattamento dei dati personali relativi al Suo stato di salute, indicati nel Modulo di Consenso Informato relativo allo studio, è indispensabile allo svolgimento dello studio stesso: il rifiuto di acconsentire al loro trattamento non Le consentirà di parteciparvi.

I campioni biologici che verranno eventualmente prelevati potranno essere trasferiti al laboratorio del Centro Proponente (Sezione di Gastroenterologia, Di.Bi.M.I.S, Policlinico Universitario Paolo Giaccone di Palermo) che li analizzerà per gli scopi collegati alla sperimentazione.

Natura dei dati

Il medico che La seguirà nello studio La identificherà con un codice: i dati che La riguardano, raccolti nel corso dello studio, ad eccezione del Suo nominativo, saranno trasmessi al Centro Studi AISF, registrati, elaborati e conservati unitamente a tale codice, alla Sua data di nascita, al sesso, al Suo peso e alla Sua statura e tutte le informazioni relative al Suo stato di salute, così come specificato nel Modulo di Consenso Informato per la partecipazione allo studio che Le è stato fornito. Soltanto il medico e i soggetti autorizzati dal responsabile della sperimentazione all'interno del Centro di sperimentazione potranno collegare questo codice al Suo nominativo.

Modalità del trattamento

I dati, trattati mediante strumenti anche elettronici, saranno diffusi solo in forma rigorosamente anonima ed aggregata, ad esempio attraverso pubblicazioni scientifiche, statistiche e convegni scientifici.

La Sua partecipazione allo studio implica che, in conformità alle normative sulle sperimentazioni, il personale del Centro Studi AISF o delle società collegate e/o esterne che eseguono per conto della prima il monitoraggio e la verifica dello studio, il Comitato etico e le Autorità sanitarie italiane potranno conoscere i dati che La riguardano, contenuti anche nella Sua documentazione clinica originale, con modalità tali da garantire la riservatezza della Sua identità.

Esercizio dei diritti

Potrà esercitare i diritti di cui all'art. 7 del D. lgs. 196/2003 ("Codice della privacy") (es. accedere ai Suoi dati personali, integrarli, aggiornarli, rettificarli, opporsi al loro trattamento per motivi legittimi, ecc.) rivolgendosi direttamente al Centro di sperimentazione _____ (*indicare il nome di una persona fisica o di un ufficio responsabile e un recapito*).

Potrà interrompere in ogni momento e senza fornire alcuna giustificazione la Sua partecipazione allo studio: in tal caso, i campioni biologici a Lei correlati verranno distrutti. Non saranno inoltre raccolti ulteriori dati che La riguardano, ferma restando l'utilizzazione di quelli eventualmente già raccolti per determinare, senza alterarli, i risultati della ricerca.

Consenso

Sottoscrivendo il presente modulo acconsento al trattamento dei miei dati personali per gli scopi della ricerca nei limiti e con le modalità indicate nell'informativa fornitami con il presente documento.

Firma dell'interessato per consenso al trattamento dei dati per lo Studio

Data

volere non volere

rendere partecipi i miei familiari circa il risultato delle analisi

volere non volere

rendere partecipi del risultato delle analisi il mio medico curante (Dr.....)

volere non volere

l'utilizzo del campione di sangue/DNA per studi futuri previa specifica richiesta da parte dei responsabili della ricerca

Mi impegno infine a comunicare tempestivamente ogni eventuale cambiamento di opinione in merito a quanto dichiarato

Data.....

Firma del Dichiarante.....

Si dichiara che tutti gli aspetti inerenti alle analisi genetiche sono stati illustrati alla persona intestata e si è data risposta a tutte le domande

Firma del Responsabile della Ricerca