МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ ГР. СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Мила Жекова Байчева

# ЧЕРНОДРОБНО УВРЕЖДАНЕ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗА

**ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование “Здравеопазване и спорт”
Професионално направление “Медицина”
Научна специалност “Педиатрия”
Шифър 03.01.50

Научен ръководител: проф. д-р Гергана Петрова Стоянова, дм

София

2023

СЪДЪРЖАНИЕ

1. УВОД……7
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР……..9
2.1. ИСТОРИЧЕСКИ БЕЛЕЖКИ……9
2.2. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ЗАБОЛЯВАНЕТО – ЕПИДЕМИОЛОГИЯ И ПРОГНОЗА……11
2.3. ГЕНЕТИЧНИ АСПЕКТИ……...16
2.4. ПАТОГЕНЕЗА И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ НА ОРГАННАТА УВРЕДА……..20
2.5. ДИАГНОЗА……38
2.5.1. НЕОНАТАЛЕН СКРИНИНГ……..38
2.5.2. ДИАГНОСТИЧНИ КРИТЕРИИ……40
2.6. КЛИНИЧНА ИЗЯВА И КОНВЕНЦИОНАЛНА ТЕРАПИЯ……42
2.7. ЧЕРНОДРОБНО УВРЕЖДАНЕ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗА…..47
2.8. ГЕННО-МОДИФИЦИРАЩА ТЕРАПИЯ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗА……57
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ……....63
3.1. ЦЕЛ……...63
3.2. ЗАДАЧИ……...63
4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ……..65
4.1. ПАЦИЕНТИ……65
4.1.1. РЕТРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ……..65
4.1.2. ПРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ……..65
4.2. МЕТОДИ……..65
4.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ……..71
5. РЕЗУЛТАТИ……...73
5.1. РЕТРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ…… 73
5.2. ПРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ……...123
6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ……139
7. ИЗВОДИ……153

8. ПРИНОСИ……155
10. СПИСЪК НА ПУБЛИКУВАНИ ТРУДОВЕ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ……157
11. БИБЛИОГРАФИЯ……..159

# ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

## НА КИРИЛИЦА

АБПА – алергична бронхопулмонална аспергилоза
АЛАТ – аланинаминотрансфераза
АлФ – алкална фосфатаза
АСАТ – аспартатаминотрансфераза
БДО – бронходилататорен тест за оценка на отговора
БЕК – билиарни епителни клетки
БОС – бронхообструктивен синдром
ГГТ – гамаглутамилтрансфераза
ГИТ – гастроинтестинален тракт
ДН – дихателна недостатъчност
ДН-аза – дезоксирибонуклеаза
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
ЕС – Европейски съюз
ИЗЗД – инсулинозависим захарен диабет
иРНК – информационна рибонуклеинова киселина
ИТМ – индекс на телесна маса
КХП – кратка характеристика на продукта
МВ – муковисцидоза
МИ – мекониум илеус
ОГТТ – орален глюкозо-толерантен тест
ПНД – пренатална диагноза
ПСК – преждевременен стоп кодон
ПХ – портална хипертония
РНК – рибонуклеинова киселина
САЩ – Съединени американски щати
СДИО – синдром на дистална интестинална обструкция
ФИД – функционално изследване на дишането
ХОББ – хронична обструктивна белодробна болест

# ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

## НА ЛАТИНИЦА

ABC – ATP-binding cassette (АТФ-свързващ касетъчен протеин)

ACs – soluble adenylyl cyclase (разтворима аденилилциклаза)

ADP – adenosine diphosphate (аденозин дифосфат)

AE2 – chloride-bicarbonate anion exchanger 2 (хлорид-бикарбонатен йонен канал 2)

AMP – adenosine monophosphate (аденозин монофосфат)

AQP1-4 – aquaporin 1-4 (аквапорини 1-4)

ATP – adenosine triphosphate (аденозин трифосфат)

ATS – American Thoracic Society (Американско торакално общество)

cAMP – cyclic adenosine monophosphate (цикличен аденозин монофосфат)

Cbp и Csk – nonreceptor Src kinases (безрецепторни кинази)

CDCA – chenodeoxycholic acid (хенодеоксихолева киселина)

CFLD – cystic fibrosis-related liver disease (чернодробно увреждане при муковисцидоза)

CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (трансмембранен регулатор на проводимостта при муковисцидоза)

CFTRm – CFTR modulators (модулатори)

DEXA – dual x-ray absorptiometry (двойноенергийна рентгенова абсорбциометрия)

EBP300 – transcriptional coactivator gene (ген за транскрипционен ко-активатор)

EBV – Epsein-Barr virus (вирус на Епщайн-Бар)

ECFS – European cystic fibrosis society (Европейско общество за муковисцидоза)

ENaC – епителен натриев канал

ERS – European Respiratory Society (Европейско респираторно общество)

ESPGHAN – European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (Европейско дружество по детска гастроентерология, хепатология и хранене)

IRT – immunoreactive trypsinogen (имунореактивен трипсиноген)

FEV1 – forced expiratory volume in 1 second (форсиран експираторен обем за една секунда)

HbA1C – glycated hemoglobin (гликиран хемоглобин)

LPS – lipopolysaccharide (липополизахарид)

MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplificiation (мултиплексна лиганд-зависима сондова амплификация)

MSSA – Methicillin sensitive staphylococcus aureus (метицилин чувствителен златист стафилокок)

MRSA – Methicillin resistant staphylococcus aureus (метицилин резистентен златист стафилокок)

MUC5AC – mucin 5A (муцин 5A)

MUC5B – mucin 5B (муцин 5B)

NASPGHAN – North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (Северноамериканско дружество по детска гастроентерология, хепатология и хранене)

NBD1 – nucleotide-binding domain 1 (нуклеотид свързващ домейн 1)

NF-KB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядрен протеин капа-B)

NHE-1 – sodium-hydrogen antiporter 1 (натрий-водороден канал 1)

NPD – nasal potential difference (назална потенциална разлика)

P2Y – purinergic surface G protein-coupled receptor (повърхностен пуринергичен G рецептор)

PAP – pancreatitis-associated protein (панкреатит-асоцииран протеин)

PKA – protein kinase A (протеин-киназа A)

Src – rous sarcoma oncogene cellular homolog (саркома онкогенен клетъчен хомолог)

TGR5 – G protein-coupled bile acid receptor (свързан с G-протеин рецептор за жлъчни киселини)

TIMP1 – tissue metallopeptidase inhibitor 1 (инхибитор 1 на тъканна металопептидаза)

TIPS – transjugular intrahepatic portosystemic shunt (трансюгуларен интрахепатален порто-системен шънт)

TLR4 – toll-like receptor 4 (тол-лайк рецептор 4)

TMD1 – transmembrane domain 1 (трансмембранен домейн 1)

TMD2 – transmembrane domain 2 (трансмембранен домейн 2)

# 1. УВОД

Муковисцидозата (МВ) е комплексно мултисистемно автозомно-рецесивно генетично заболяване, при което са засегнати функциите на дихателната система, храносмилателния тракт и всички екзокринни жлези. Заболяването се дължи на мутация в гена за регулатора на трансмембрания транспорт при МВ (*CFTR* – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), чиято основна функция е да регулира обема на течностите по епителната повърхност чрез секреция на хлориди и потискане абсорбцията на натрий (125, 261). Поради абнормния транспорт на електролити и вода в апикалния край на клетките, най-честата изява при МВ е прогресиращо белодробно заболяване и хронична диария, свързана с екзокринна панкреасна недостатъчност (306, 296).

Чернодробното увреждане при МВ (Cystic fibrosis-related liver disease (CFLD) е една от основните причини за смърт при засегнатите индивиди, въпреки че тежките форми рядко се изявяват преди пубертета. След кардио-респираторните проблеми и трансплантационните усложнения, чернодробното заболяване е трета водеща причина за смърт, отговаряща за 2.5% от общата смъртност при МВ (13). CFLD се определя от патогенезата, свързана с подлежащите нарушения на *CFTR* на ниво холангиоцити, а вероятно и други фактори – модифициращи гени и епигенетични механизми (71). Морфологичните промени и клиничната изява са разнообразни, като основна хистологична характеристика остава фокалната билиарна фиброза, която най-често е безсимптомна. В черния дроб е налице хипервискозитет на жлъчката, обструкция на жлъчните канали, възпалителни промени и фокална фиброза. Порталната хипертония (ПХ), като усложнение на билиарната цироза или в резултат на порто-синусоидална съдова болест, играе важна

роля в прогресията на чернодробното увреждане, малнутрицията, инфекциозните усложнения и смъртността при CFLD (67, 101).

Неонаталният скрининг за МВ е рутинно въведен в много Европейски държави (198). Въпреки това, идентифицирането на пациенти в риск да развият чернодробно увреждане остава основен клиничен и диагностичен проблем. Липсват ясни генотип-фенотип корелации. Някои фактори все пак се асоциират с чернодробно увреждане, например мекониум илеус, но предразполагащата му роля все още се уточнява (247).

В диагностичен план ехографското изследване на хепатобилиарната система заема основно място в установяването и мониторирането на прогресията на чернодробното увреждане. Въвеждат се и нови методики за проследяване на пациентите, търсят се ранни прогностични маркери, дефинират се диагностични алгоритми (101).

Целта на лечението при МВ е да се поддържат нормални функции на засегнатите органи. Комплексният подход, подобряването на грижите и новите терапевтични възможности при МВ допринесоха за увеличаване продължителността и качеството на живот на тези пациенти (24).

# 2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

## 2.1. ИСТОРИЧЕСКИ БЕЛЕЖКИ

МВ е комплексно автозомно-рецесивно генетично заболяване, дължащо се на мутация в един ген (и съответно един протеин). Хората са умирали от МВ хилядолетия наред, докато първите описания на болестта датират отпреди няколко века (45). „Горко на това дете, което целунато по челото е солено. То е обречено и скоро ще умре.“ Тази средновековна пословица от северноевропейския фолклор е едно от най-ранните описания на фаталното генетично заболяване (213).

Остава трудно да се отбележи точно произхода на МВ, поради това, че едно генетично заболяване може да е съществувало още от началото на човечеството. X. Estivill et al. предполагат, че МВ се е появила в Европа преди около 52000 години, въпреки че популацията е била различна от съвременната в генетичен аспект (129).

Преди началото на 20 век съществуват публикации в различни източници, голяма част от които са свързани със соления вкус на кожата на засегнатите кърмачета и малки деца. В Испания около 1606 година се открива описание в медицинската литература от Juan Alonso de Fontecha – испански лекар, фармаколог и писател, професор в Университета на Алкала, който пише, че пръстът докоснат до челото на болното дете остава солен. Други описания на увредени деца и съпътстващ солен вкус на кожата могат да се открият в Европейската литература от 17 век (144).

Първото макроскопско патоанатомично описание на процеса вероятно е направено от холандския анатом и ботаник Peter Pauw. През 1595 година в Лайден, където е ректор на университета, той прави аутопсия на 11 годишно момиче и описва панкреаса като уголемен, уплътнен и лъскав, след като го разрязва и отваря. Той

заключава, че смъртта се дължи на заболяване на панкреаса. За първи път сред фолклорните вярвания за прокълнато дете със солена кожа се намесва и истинска органична причина за заболяването (144).

През 1838 година във Виена Carl Von Rokitansky описва резултати от една от направените от него аутопсии. Касае се за 7 месечен фетус без признаци за постнатален живот, при който се наблюдава перфорация на тънкото черво и голямо количество мекониум в перитонеалната кухина със съпътстваща възпалителна реакция. Най-вероятно това е и първото описание на мекониум илеус (144).

Тежката малнутриция при МВ е причина дълго време заболяването да се е приемало като вид целиакия. През 1936 година проф. Гуидо Фанкони постулира вероятна връзка между целиакията и кистичната фиброза на панкреаса с бронхиектазии, и пише своя труд „Фамилна панкреасна кистична фиброматоза с бронхиектазии“ (131, 239). Едва през 1938 година Дороти Андерсън, която е педиатър и патолог, описва патологичния субстрат на заболяването – множество кистични образувания и разрастване на фибротична тъкан в панкреаса, от където идва и пълното име на заболяването – кистична фиброза на панкреаса (38, 191). Д-р Андерсън се счита за откривател на болестта, тя разработва и първия метод за диагностика на МВ.

През 1945 един от най-видните лекари в областта на детската онкология Сидни Фарбер предлага термина „муковисцидоза“ с идеята, че заболяването не е локализирано само в панкреаса, а е по-скоро проблем с нарушение в продукцията на мукус. Терминът се налага във френско- и немскоезичните страни, а англосаксонските публикации съкращават името дадено от проф. Андерсън на кистична фиброза. Съкращението се налага, не само заради изказаното мнение на проф. Фарбер, но и поради множество публикации, насочващи към засягане и на белите дробове (132).

Изучавайки 47 семейства с пациенти, засегнати от заболяването, Андерсен и Ходж през 1946 година заключават, че то се унаследява автозомно рецесивно (39).

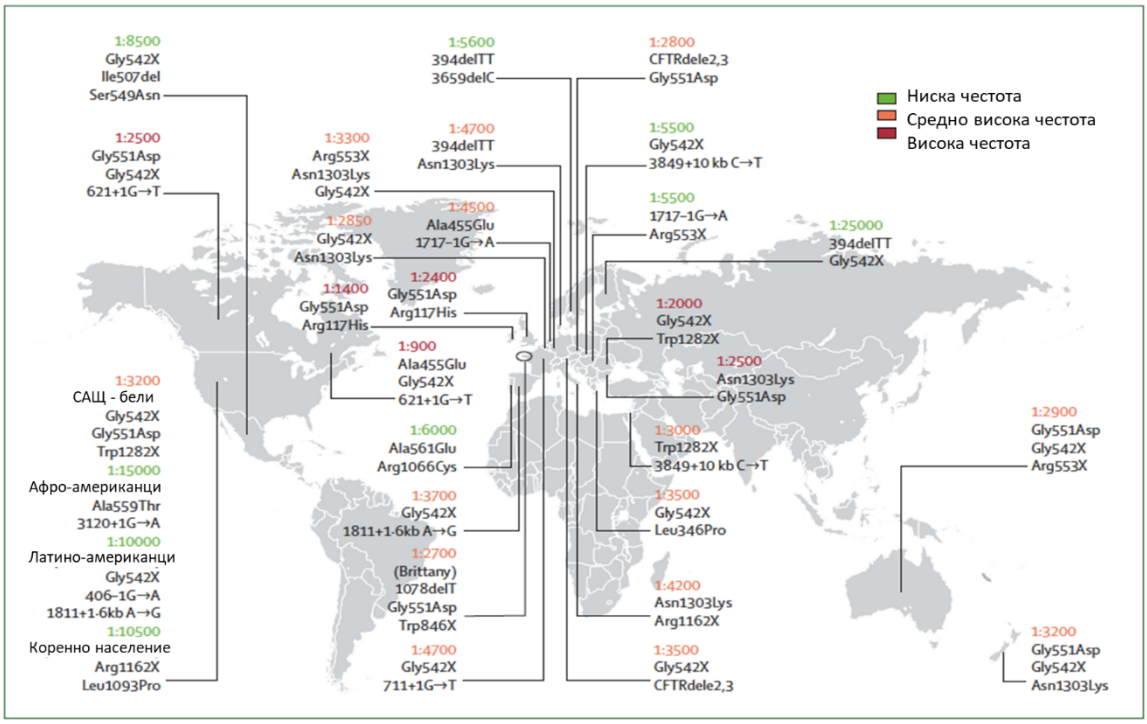
През 1953 година откриването на дефекта на ниво повишено отделяне на хлориди в потта, както и стандартизирането на потния тест, позволява да започне идентификация на по-леките случаи (262). Поставят се основите на терапевтичните насоки и протоколи, които остават и до днес – оптимизиране на храненето, подобряване клирънса на белите дробове и лечение на белодробната инфекция.

През 1985 година активно се проучва гена на 7 хромозома и се доказва, че заболяването МВ се причинява от дефектно функциониране на хлорния канал, зависим от cAMP (144, 286). Това е потвърдено чрез идентификация на гена и неговия протеин CFTR през 1989 от две независими групи посредством позиционно клониране от Lap-Chee Tsui и John Riordan от Торонто, както и от Francis S Collins от Мичиган (175, 242, 244). През 1991 година се уточнява как CFTR протеинът формира хлорния канал, и че се нуждае от ATP хидролиза, за да се отвори (40, 41). Това позволява да се изработят нови диагностични тестове и възможности за проучване на нови, включително генни терапии.

## 2.2. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ЗАБОЛЯВАНЕТО – ЕПИДЕМИОЛОГИЯ И ПРОГНОЗА

В световен мащаб се приема, че около 90000 души са болни от МВ, като честотата на заболяването варира в зависимост от местоположението, етническия произход, популационни и миграционни характеристики. Въз основа на епидемиологични проучвания очакваната честота на МВ се счита за около 1/2500 живородени в Европейската популация (182). Данни от програмите за неонатален скрининг през последните години обаче, които са по-

надеждни, показват че честотата е по-малка от описваната в миналото (269, 296). Важно е да се стандартизира докладването на случаите в световен мащаб, когато се сравняват данни за разпространението на болестта, например пациентите с фалшиво отрицателни или фалшиво положителни резултати, както и тези с мекониум илеус. Понастоящем, честотата на МВ е между 1/3000 и 1/6000, което кореспондира на носителство на мутация съответно 1/28-1/40 (Фигура 1) (281).




Фигура 1 (по Sullivan, B.P.; Freedman, S.D. *Lancet* 2009,373,1891–1904): Приблизителна честота на МВ и чести мутации по държави.

Според последни данни в Европа честотата е между 1/1353 за Ирландия и 1/25000 за Финландия, средно 1/4500 за Западна Европа и 1/6000 за Северна и Централна Европа. В Австралия честотата е около 1/3000, в Канада приблизително 1/3300 и в САЩ 1/4000, но следва да се имат предвид и етническите вариации. Много висока честота на разпространение на МВ се наблюдава в някои малки изолирани популации, вероятно във връзка с генно натрупване, като

общността на Амишите в Охайо (1/569) или в селището Saguenay-Lac-Saint-Jean в Квебек, Канада (1/902). Заболяването е много по-рядко в други части на света. Например, в Южна Америка, въпреки липсата на достатъчно данни и скринингови програми, честотата на МВ се счита за приблизително от 1/8000 до 1/10000, в границите от 1/6100 за Аржентина до 1/15000 за Коста Рика. В Азиатската популация честотата е по-достоверно определена в последните години, но остава под реалната за повечето държави. По-висока честота се наблюдава в Средния Изток, поради кръвнородствените бракове, варира от 1/2560 за Йордания до 1/350000 за Япония. За Индийската популация честотата е от 1/10000 до 1/100000. Все още липсват достатъчно данни за Африка (46, 79, 281).

Редица научни изследвания изучават промените в честотата на разпространение на МВ. Повечето от тях установяват намаляване на случаите, но не всички (50). Две студии, които обобщават данни за Колорадо и Уисконсин, САЩ, съобщават за нарастване броя на болните от МВ (221). Анализ на данните от западна Франция за период от 35 години обаче, показва значително намаляване на случаите – от 1/1983 през 70-те години на 20 век до 1/3268 за периода 2005–2009 година (256). Като важен момент е отчетено въвеждането на пренаталната диагностика през 1980 година.

Тенденциите за промяна в честотата на разпространение на МВ са мултифакторни. От една страна са демографските процеси на смесване на различни популации, намаляване на кръвнородствените бракове, както и намаляване на фертилитета глобално, а от друга – въвеждането на генетично-базирани политики на здравеопазване, позволяващи превенция чрез осигуряване на надеждна пренатална и предимплантационна диагностика, тестуване в семейството за носителство на мутации, пренатален скрининг, популационен скрининг за носителство и други (270). Разбира се, някои социални и етични аспекти, като отказа за генетично тестуване, провеждане на

пренатална диагностика и прекъсване на бременността, също дават отражение върху горепосочените процеси (236).

Прогнозата на пациентите с МВ значително се подобрява през последните години. Едно от най-важните доказателства за това е постоянното увеличаване на пропорцията възрастни пациенти, които понастоящем надвишават 50% в повечето държави, дори са около 60% в Канада (100). Пропорцията възрастни пациенти в Канада почти се е удвоила за последните 35 години от 29.5% през 1984 до 61.5% през 2018 година. Това нарастване в глобален мащаб продължава, както показват данните и от Европейския регистър на болните с МВ, според които се очаква броят на пациентите над 18 годишна възраст да се увеличи със 75% от 2010 до 2025 година. (Таблица 1) (258).

| **Регистър на пациенти с МВ** | **Година** | **Пациенти, брой** | **Средна възраст, години** | **Възраст ≥ 18 г. %** | **Възраст ≥ 40 г. %** | **Средна възраст смърт, години** | **Средна възраст преживяемост, години** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Австралия | 2017 | 3151 | 19.6 | 53.7% | - | 35.6 | - |
| Белгия | 2016 | 1275 | 22.5 | 61.2% | - | - | - |
| Канада | 2018 | 4370 | 23.5 | 61.5% | 15.9% | 33.0 | 52.1 |
| Франция | 2017 | 7114 | 20.3 | 55.9% | 11.9% | 33.8 | - |
| Ирландия | 2018 | 1239 | 20.9 | 58.5% | 11.3% | 33.0 | 44.4 |
| Обединено кралство | 2018 | 10509 | 20.0 | 54.7% | - | 32.0 | 47.3 |
| САЩ | 2018 | 30775 | 19.8 | 54.6% | - | 30.8 | 47.4 |

Таблица 1 (модифицирано по Scotet V et al, *Genes (Basel).* 2020;11(6):589): Характеристики на популацията пациенти с МВ и очаквана преживяемост според националните регистри.

МВ, доскоро считана за педиатрично заболяване, постепенно става болест и на възрастните (263). Диагностичните търсения се предефинират, за да обхванат и пациенти в зряла и напреднала възраст, особено в държави без национални неонатални скринингови програми. Редица фактори са отговорни за този напредък – стандартизация на грижите, лечение на пациентите в центрове с мултидисциплинарни екипи, по-добър контрол на белодробните

инфекции с развитието на нови инхалаторни терапии, по-добър контрол на колонизацията с *Pseudomonas aeruginosa*, оптимизиране на храненето с прием на хранителни добавки и високоенергийни продукти, прием на адекватно количество панкреасни ензими, ранна диагностика посредством неонатален скрининг и достъп до белодробна трансплантация (13, 22). Персонализираният подход в грижата подобрява както индивидуалните, така и общите резултати от лечението на пациентите с МВ (84, 230).

Процесите на плавно и безопасно прехвърляне на пациентите към специалистите за възрастни (т. нар. *transition medicine*) са ключови, както за болния, така и за неговото семейство. Трудностите в това отношение са свързани с липсата на ясни правила и финансиране за навременно планиране на този процес. Оценката на качеството на живота и влиянието на различни психо-социални проблеми дават възможност за превенция на медицински усложнения и психологически кризи (25). Сериозен проблем при по-големите деца и младите възрастни остава придържането към терапията, което е пряко свързано с постигнатите резултати (17). Навлизат и нови елементи в лечението и проследяването на пациентите – заетост и професионална реализация, семеен живот и родителство (173). Увеличава се броят на бременностите и ражданията на деца на болни с МВ, поради което се обсъжда и безопасността на новите медикаменти CFTR модулатори по време на бременност и кърмене (263). В резултат на променящата се епидемиология са налице все повече проучвания при пациенти над 40 години, което ще подпомогне разбирането и знанието за болните с лек фенотип и диагностицираните в зряла възраст, което от своя страна ще даде възможност за дефиниране на предиктори за преживяемост за цялата популация (70, 275).

Предоставянето на най-съвременна информация на пациентите относно преживяемостта е от особено значение за семействата, но и

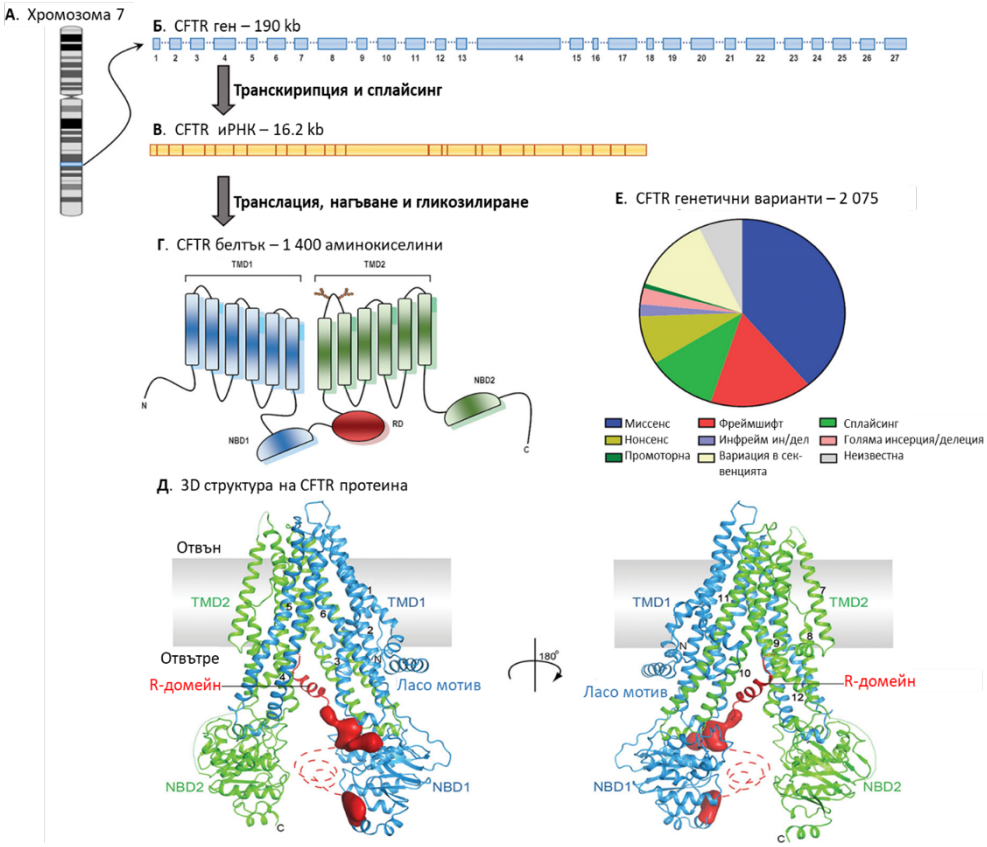
в глобален мащаб. Така ще може да се планира адекватна медицинска грижа, психологическа и социална подкрепа, модерно здравеопазване с осигуряване на превенция и лечение, както и развитие на нови терапевтични стратегии и възможности (86).

## 2.3. ГЕНЕТИЧНИ АСПЕКТИ

Един от най-големите научни успехи в познанието за МВ е откриването през 1989 година на гена, отговорен за заболяването (89). Това дава надежда за развитие на нови терапевтични възможности в бъдеще с напредването на технологиите за генна терапия (146, 244). В основа на патогенезата на МВ стои загубата на функция на протеина регулатор на трансмембрания транспорт при муковисцидоза (CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). *CFTR* генът е картиран на дългото рамо на хромозома 7 (7q31.2) и е един от най-големите гени в човешкия геном, като понастоящем са описани над 3000 мутации. В резултат на мутация не се синтезира протеин или той е нефункционален, което от своя страна се проявява с нарушено йонно равновесие от двете страни на мембраната. *CFTR* се състои от 250 килобази геномни последователности и кодира епителиален клетъчен протеин, съставен от 1480 аминокиселини в зряло състояние. CFTR протеинът се разполага на апикалната мембрана на епителните клетки на жлъчните и панкреасни канали, в интестиналните крипти, в трахео-бронхиалното дърво, бъбречните канали, семепроводите и потните жлези (194).

CFTR принадлежи към семейството на ABC (ATP-binding cassette – АТФ-свързващите касетъчни) протеини – голяма група свързани протеини, които споделят трансмембранни транспортни функции. Той формира хлорен канал по протежение на клетъчната мембрана, чиято функция се регулира чрез фосфорилиране от cAMP-

зависима фосфокиназа. CFTR фосфорилирането в присъствието на АТР предизвиква отваряне на канала и освобождаване на около 10 хлорни йона извън клетката всяка минута (Фигура 2) (190, 305).




Фигура 2 (по Lopes-Pacheco, M. *Front in Pharmacol.* 2020;10:1662): *CFTR* – ген и протеин: А – хромозома, Б – ген, В – иРНК, Г – протеин, Д – пространствена структура на протеина, Е – генни варианти.

Генетичната мутация, установявана най-често при болните от МВ, е делеция на фенилаланин 508 (F508del), за която се счита, че е възникнала преди 53000 години (207). Тя се среща при приблизително 70% от пациентите по света, но честотата й силно варира в различните популации (28, 285). От описаните в литературата мутации само около 340 са определени като причиняващи заболяване и водят до: нарушен йонен транспорт и силно намаление на хлорната пропускливост на епителните абсорбиращи и секретиращи клетки, дехидратация и повишен риск

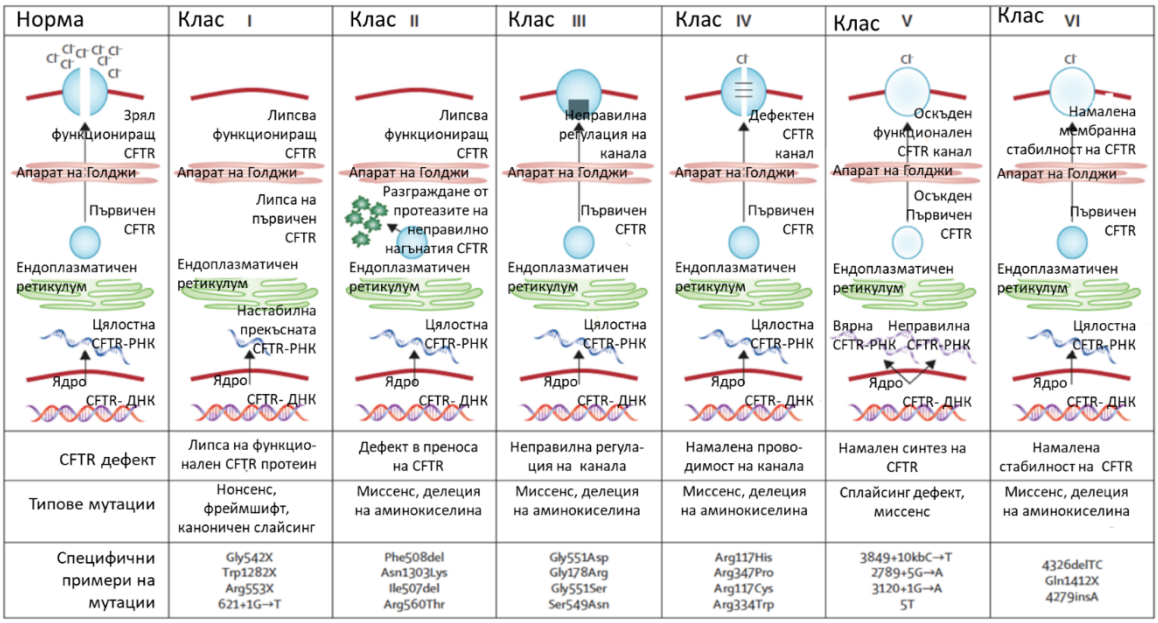
за колонизиране с мултирезистентни микроорганизми (291, 306). По-голямата част от мутациите в *CFTR* гена са с промяна във функцията на протеина (т. нар. *missense*), но са описани и такива с промяна на рамката или сплайсинга, с липса на протеин, както и различни по размер делеции и инсерции (49).

Част от описаните *CFTR* мутации не повлияват активността на получения белтък (йонен канал) и се приемат за нормални варианти – напр. I148T. Една малка част от мутациите все още попадат в групата на т. нар. мутации с неясно клинично значение като например D1152H, които в зависимост от другата мутация се изявяват като причиняващи заболяване или като нормални варианти. Допълнително, в зависимост колко е засегната функцията на CFTR-канала, са описани мутации с остатъчна или частична активност (напр. R347P, 3849+10k C->T) и такива с минимална до липсваща (напр. G542X, F508del, N1303K). Например, установяване на генотип delF508/A455E е асоцииран с абнормен потен тест и по-късно начало на белодробното засягане. Наличието на P205S е описано също при пациенти с леко изразена симптоматика на заболяването (19).

Както бе споменато по-горе, генетичната мутация, установявана най-често при болните от MB, е F508del, при която е налице делеция на три бази, кодиращи фенилаланин на позиция 508 в протеина. Относителната честота на тази мутация в различните популации варира (8, 28). Наблюдаван е градиент на увеличаване от югоизток към северозапад сред европейците – с най-висока честота са датчаните с 82%, а по-рядко тя се среща в Средиземноморието – в по-малко от 50% от мутациите (20, 105).

В зависимост от типа нарушена функция на CFTR протеина патологичните мутации се разделят на 7 класа, според съвременната класификация, която добавя и клас VII: липса на синтеза на белтъка (клас I – липса на белтък); дефектна матурация на протеина и преждевременна деградация (клас II – липса на транспорт); нарушена

регулация (клас III – нарушена функция на канала); дефектно пропускане на хлора или блок на канала (клас IV – нарушена пропускливост); намален брой CFTR транскрипции или сплайсинг аномалии (клас V – намален синтез); повишено износване на канала на клетъчната повърхност (клас VI – по-малка стабилност на канала) и липса на информационна РНК (клас VII), което обуславя голямата фенотипна вариабилност и различният подход за генно-модифициращата терапия (Фигура 3) (64, 124).



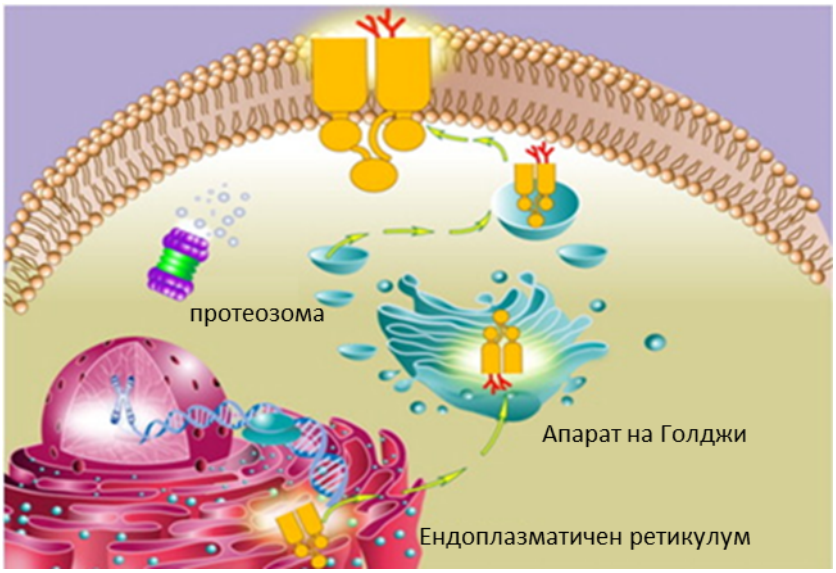

Фигура 3 (по Boyle MP, De Boeck K. *Lancet Respir Med*. 2013 Apr;1(2):158-63: *CFTR* – класове мутации.

Традиционната класификационна система категоризира *CFTR* мутациите в шест класа. Въпреки това, De Boeck и Amaral разделят клас I мутациите в клас I (стоп-кодон мутации) и новия клас VII (без транскрипция на иРНК) (103). Клас VII мутациите водят до същия резултат, а именно загуба на CFTR протеин, но не могат да бъдат повлияни от коректорна терапия. Наричат се още „неспасяеми“ мутации, тъй като не могат да бъдат повлияни медикаментозно с новите модифициращи терапии. Това са големи делеции, като например dele2,3 (21kb) мутация (111, 261). Въпреки това се

разработват нови възможности за лечение, които да са независими от мутационния клас, което дава надежда и за тези пациенти.

## 2.4. ПАТОГЕНЕЗА И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ НА ОРГАННАТА УВРЕДА

При физиологични обстоятелства *CFTR* генът осигурява транскрипция и транслация в CFTR протеин, който се придвижва до клетъчната мембрана, където осъществява своята функция като хлорен канал (Фигура 4) (192).



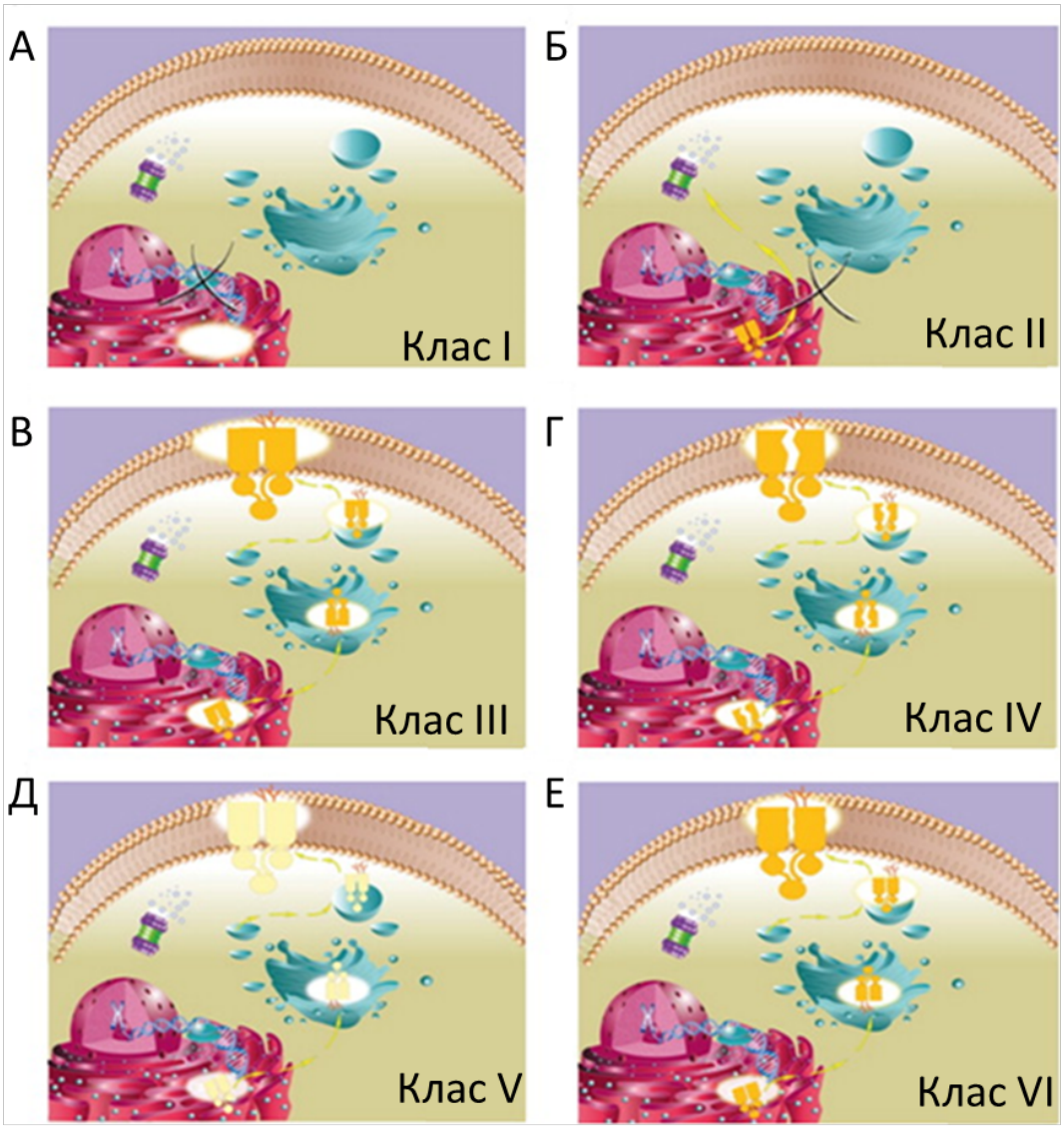

Фигура 4 (по Lubamba B et al, *Clinical Biochemistry* 2012;45:1132–1144): Нормална биосинтеза на CFTR протеин.

Мутациите при МВ нарушават функцията на CFTR протеина по различни механизми – от пълна загуба на синтезиран протеин до нормална апикална експресия на протеин, но с лоша хлорна проводимост (Таблица 2). Подробното изучаване на механизмите на дисфункция на CFTR е пряко свързано с развитието на фармакологични възможности за повлияването им. Важно е да се има предвид, че някои мутации могат да имат характеристики на няколко класа (285). Мутацията F508del, която е прототип на клас II мутация, води до неправилно нагъване на протеин и преждевременното му

деградиране и невъзможност да достигне до апикалната мембрана, освен в експериментални условия на по-ниски температури. Мутациите от класове I–III водят до производство на намален или дисфункционален протеин и се асоциират с тежък фенотип. Мутациите от класове IV и V се асоциират с остатъчна CFTR-медиирана активност и по-лек фенотип. Въпреки, че са налице малко проучвания с пациенти от клас VI мутации, те се класифицират като тежки (Фигура 5) (192).

| **Клас** | **Ефект върху функциите на белтъка** | **Пример за молекулен дефект** |
|---|---|---|
| **Тежка клинична изява на МВ** | | |
| I | Скъсен белтъчен продукт | Преждевременна поява на стоп кодон или мутации в екзон-интрон сплайс участъците **(G542X, W1282X, R553X, 3950delT)** |
| II | Белтъкът не може да достигне до клетъчната мембрана | CFTR е синтезиран в незряла форма, частично гликозилиран, не се освобождава от ендоплазматичния ретикулум **(F508del, N1303K, S945L, H949Y, D979A)** |
| III | Пропускливостта на канала не се регулира правилно | CFTR е синтезиран и транспортиран до мембраната, но неговата активация и регулация от ATP или cAMP са нарушени **(G551D)** |
| **Лека клинична изява на МВ** | | |
| IV | Намалена хлорна проводимост на канала | CFTR е синтезиран и транспортиран до мембраната, но не пренася хлорните йони **(R117H, G622D, M1137V, I1139V, D1152H, D1154G)** |
| V | Намален синтез на нормален продукт, обикновено свързан с неправилно процесиране | CFTR синтезата и процесирането са частично дефектни **(A455E, екзон 8 Tn, 1717-9T-C, D565G, 3849+10kb C>T, 3272-26 A>G)** |
| **Тежка клинична изява на МВ** | | |
| VI | Нестабилност на белтъчния продукт | Мембранна нестабилност и нарушена хлорна проводимост **(Q1412X, 4326delTC, 4279insA, 4271delC, 1811+1.6kb A>G)** |

Таблица 2: Мутации в *CFTR* според ефекта върху белтъчния продукт.




Фигура 5 (по Lubamba B et al, *Clinical Biochemistry* 2012;45:1132–1144): Патофизиология на протеина при различните класове мутации на *CFTR*.

Патофизиологичните механизми на органна увреда при МВ са разнообразни. Те все още се изучават, откриват се нови субстрати и маркери, част от които в бъдеще ще служат за създаване на нови диагностични и терапевтични алгоритми.

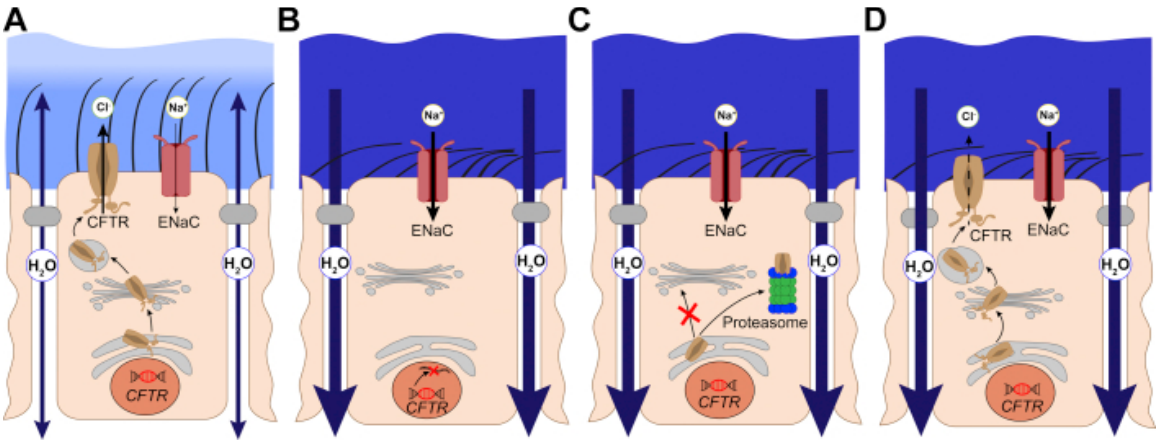
При здрави индивиди CFTR функционира като цикличен аденозин монофосфат (cAMP)-зависим, фосфорилиран активиран йонен канал, който медиира хлорния и бикарбонатен транспорт през апикалната клетъчна мембрана на епителните клетки по хода на дихателните пътища, гастроинтестиналния тракт, билиарния епител,

каналите на потните жлези и др. При пациенти с МВ дисфункционалният CFTR води до дехидратация и ацидификация на мукозните повърхности, и формиране на вискозен лепкав мукус, който запушва луменните пространства и каналите, като по този начин увреждa белите дробове, червата, панкреаса, черния дроб и други (14, 124).

МВ е заболяване с комплексен и хетерогенен клиничен спектър, като на органно ниво е налице акумулиране на секрети бедни на вода и хипервискозен мукус, които компрометират мукоцилиарния клирънс и водят до тежко възпаление с последваща деструкция. Ролята на променените характеристики на мукуса при заболяването е проучвана още от средата на миналия век (56). Белодробното засягане при МВ се определя от обструкция на дихателните пътища, възпалителни процеси и повтарящи се инфекции, които прогресивно увреждат белите дробове и водят до тежка дихателна недостатъчност и смърт (6, 281).

Основният механизъм в развитието на белодробното увреждане при МВ е свързан с дисфункционалния CFTR протеин (85). При нормален епител на дихателните пътища CFTR-медиираната хлорна секреция и натриевата абсорбция, медиирана от епителния натриев канал ENaC, се координират за поддържане на течността в дихателните пътища в състояние да позволи на цилиите да се движат ефективно и да придвижват мукуса по повърхността на епителa. Липсата или нарушената функция на CFTR протеина води до два процеса в дихателните пътища – първият е свързан с намалена пропускливост на епителa за хлорните йони, което води до намалена хлорна секреция и по-малко сол на апикалната повърхност. В резултат на това, стимулирането на потока вода към лумена е нарушено. Вторият механизъм, при липса на CFTR активността на ENaC е непроменена, и това води до нерегулирана и неадекватна абсорбция на соли към течността в дихателните пътища. Мукусът

става дехидратиран, притиска цилиите и те се увреждат с последваща невъзможност за ефективен мукоцилиарен клирънс (Фигура 6) (149, 192).




Фигура 6 (по Gentzsch M, Mall MA. *Chest.* 2018 Aug;154(2):383-393): CFTR при здрави дихателни пътища и молекулни механизми, водещи до CFTR дисфункция при МВ.

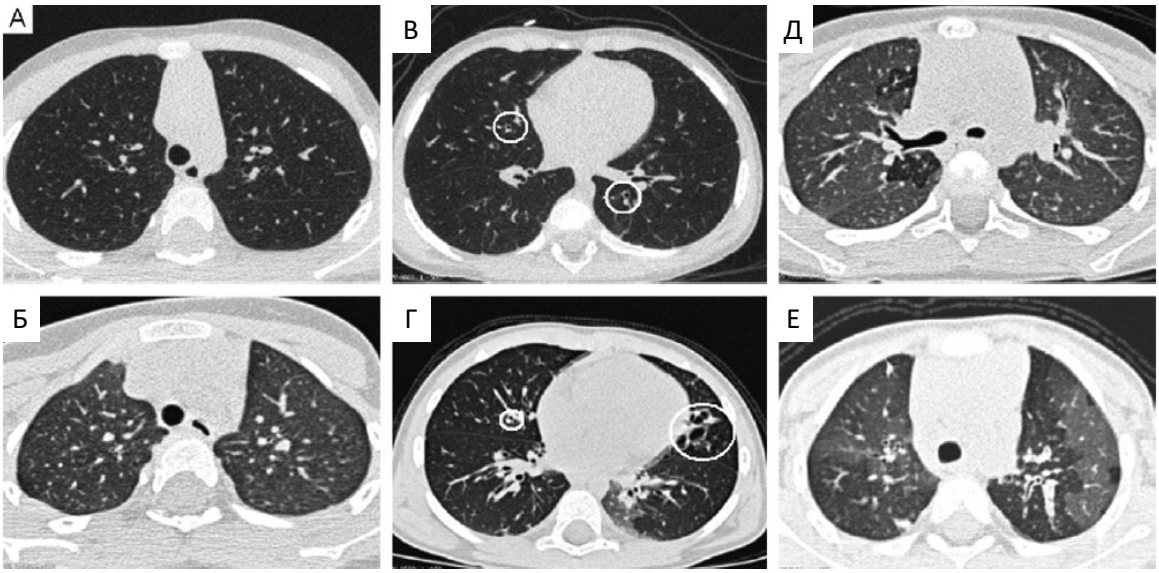
Доминиращата патология в белите дробове при МВ е възпалението, което възниква при невъзможност за очистване от микроорганизмите и образуването на токсична проинфламаторна локална среда. Белодробното възпаление започва още в ранна възраст, като вече са налице редица компютър-томографски доказателства за бронхиектазии при около една трета от пациентите през първите няколко месеца от живота (83). Бронхиектазиите се асоциират с повишена концентрация на неутрофилна еластаза, която допълнително увреждa механизмите на вродения имунитет, повишава мукусната продукция, увреждa пептидите и протеините на дихателните пътища и унищожава екстрацелуларния матрикс. Неутрофилната еластаза и други протеази на неутрофилите, като катепсин S и матриксни металопротеази, са основна причина за увреждането и развитието на бронхиектазии (75, 231). В диференциално диагностичен план следва да се имат предвид и

вродени бронхиектазии (4), но подобна находка изисква скриниране за МВ, особено в страни без програма за неонатален скрининг.

Mott LS et al. през 2012 година публикуват данни от проучване, което има за цел да определи дали ранните структурни промени в белите дробове при МВ персистират и прогресират след 1 годишна възраст, и да идентифицира факторите, свързани с рентгенологичните промени. Те изследват 143 деца с МВ на възраст 0.2-6.5 години, диагностицирани от неонаталната скринингова програма. Компютърните томографии за анализа са оценени за бронхиектазии и обструктивни промени, и са анализирани двукратно през една година, като са търсени статистически значими корелации между персистиране на горепосочените промени и възрастта, пола, *CFTR* генотипа, панкреасната инсуфициенция, респираторните симптоми, неутрофилното възпаление и инфекциите. Установено е, че веднъж възникнали, бронхиектазиите персистират при 98/133 томографки образи (74%), а обструктивните промени са налице при 178/220 (81%). Тежестта на бронхиектазиите нараства при 139/227 (63%) от проучените образи, а обструкцията – при 121/264 (47%). Установената прогресия се асоциира с по-тежък *CFTR* генотип, изразено неутрофилно възпаление и наличие на белодробна инфекция (208). Ето защо е необходима ранна интервенция за предотвратяване на тези промени и прогресията на структурно белодробно увреждане при най-малките пациенти с МВ.

Sly PD et al. една година по-късно (2013) правят опит да дефинират рисковите фактори за ранно начало на бронхиектазиите, като изследват 127 деца с диагноза МВ след неонатален скрининг. При всички тях са направени компютърна томография на белите дробове и бронхоалвеоларен лаваж на възраст 3 месеца и след това на 1, 2 и 3 години. Резултатите показват, че наличието на бронхиектазии нараства от 29.3% от изследваната група на 3 месечна възраст до 61.5% на 3 годишна възраст. Мултивариабилен анализ

показва, че рискови фактори за бронхиектазии са мекониум илеус (p=0.002), респираторни симптоми (p=0.008), активност на свободната неутрофилна еластаза (p<0.001) и обструктивни промени в белите дробове (p=0.01). Става ясно, че структурни белодробни нарушения могат да бъдат открити през първата година от живота и активността на неутрофилната еластаза от бронхоалвеоларен лаваж в ранната възраст се асоциира с ранна поява на бронхиектазии при деца с МВ (264). Това е доказано и в проучване на Stick SM et al. от 2009 година (Фигура 7) (277).




Фигура 7 (по Stick SM et al, *The Journal of Pediatrics*, 2009;155-5;623-628): Компютърна томография на бели дробове с нормален инспираторен (А) и експираторен образ (Б), бронхиектазии (в кръгче) (В, Г) и обструкция (Д, Е).

Хидратацията на дихателните пътища е ключова в поддържането на физиологичен мукус. С неговата бариерна функция между епитела и външната среда той осигурява първичните защитни механизми в дихателни пътища. Все още се изучава точната структура, развитието и поддържането на тази първична бариера. Повечето модели определят мукусния слой като покриващ цилиите подобно одеяло, докато те се движат във водния слой, наричан перицилиарна течност. Clunes MT и Boucher RC (2007) установяват,

че покривната течност в дихателните пътища се състои от два компонента с различни свойства – долен слой на перицилиарна течност и горен слой на мукусно покритие. Солите и водата са налични и в двете фази. Електронна микроскопия разкрива, че е налице организирана структура на перицилиарното пространство, в която горният слой съдържа полимерен гел, съставен от муцини с високо молекулно тегло MUC5AC и MUC5B, секретирани от гоблетовите клетки и субмукозните жлези. Вискозните и еластични свойства се определят от самите муцини, но и от други макромолекули, като глобулини, протеини и ДНК, както и от нивото на хидратация на течността (85).

При физиологични обстоятелства мукусът съдържа около 1% сол, 1% муцини и 98% вода, и има характеристика на вискозна течност с малък еластичен компонент. Това е важно, защото течността покрива ефективно дихателните пътища, а еластичността подава кинетична енергия на ресничките за тяхното движение. При пациентите с МВ мукусът е уплътнен и с по-изразена еластичност, по-адхезивен, което затруднява очистването му (88, 232).

Друг компонент на вродената белодробна защита са някои разтворими антимикробни субстанции, като лактоферин. Той се секретира в течността на дихателните пътища и има особена роля при инфекция с *Pseudomonas aerigunosa* за превенция формирането на колонии. При децата с МВ честите вирусни и бактериални инфекции на дихателните пътища, например с *Haemophilus influenzae* и *Staphylococcus aureus*, водят до директно и индиректно увреждане, свързано с възпалителния процес. С прогресиране на заболяването се развиват и бронхиектазии, а това води до повишена възприемчивост към Грам-отрицателни бактерии (124). Тези микроорганизми са обичайни обитатели на средата и се асоциират с активна инфекция при имунокомпрометиран гостоприемник или при нарушение в целостта на епителната повърхност. *Pseudomonas aeruginosa* е

доминиращ патоген при пациентите с МВ. Други Грам-отрицателни причинители също се наблюдават с повишена честота – *Stenotrophomonas maltophilia* и *Achromobacter spp*. Обикновено те са резистентни към антибиотиците с Грам-негативна насоченост, а при възникване на инфекция лечението най-често е венозно, за да се постигне ефективна ерадикация. Други бактерии, които се асоциират с висока смъртност при болните с МВ са от комплекса *Burkholderia cepacia*. Необходим е строг контрол на инфекциозната колонизация и ранна ерадикация (150, 222, 294).

Белите дробове при МВ представляват възпалителна микросреда (87). Съществуват редица данни, които подкрепят хипотезата, че променениият CFTR стимулира епителните клетки в проинфламаторна активност, в сравнение с нормалните здрави клетки. Вероятно това е във връзка с ранната възраст и инфекциозните усложнения, но механизмите все още се дебатират (148, 249). Подобни са промените и на ниво холангиоцити, което ще даде възможност за проучване на нови механизми на увреда и в черния дроб, както и на нови възможности за лечение (138, 139).

По отношение на другите органи и системи патогенетичните механизми също продължават да се проучват активно от изследователските групи. От страна на гастроинтестиналния тракт (ГИТ) е налице тежка малдигестия на базата на панкреасна инсуфициенция, наблюдавана при 85% от пациентите с МВ. Тя води до стеаторея, малабсорбция, изоставане във физическото развитие, ниско тегло (216, 299). Ранните симптоми от страна на ГИТ включват и мекониум илеус, който се наблюдава при 10-17% от пациентите през първите дни от живота (20).

Приблизително 85% от бебетата родени с МВ развиват панкреасна недостатъчност, обикновено тези с тежки *CFTR* мутации от класовете I–IV и VI. Около 3% от новородените с тежки мутации е възможно да нямат панкреасна недостатъчност, но да я развият с

времето. Пациентите с по-леки мутации от класовете IV и V е много вероятно да имат запазена екзокринна панкреасна функция, но могат да изявят панкреатит (15).

Маркер за панкреасна функция е фекалната еластаза, която обикновено е <200 μg/g при налична инсуфициенция. Трябва да се има предвид, че този тест не е диагностичен за МВ, а само допълнителен при оценка функцията на панкреаса. Измерването на фекална еластаза не зависи от приема на панкреасни ензими.

Счита се, че пациентите с панкреасна недостатъчност ще се нуждаят от ензимзаместителна терапия през целия си живот, както и от суплементация с мастноразтворими витамини (A, D, E и K) (59). Понастоящем, ензимното заместване при пациентите с МВ е с препарат от свински произход в капсули, предназначен за перорално лечение. Липсва течен еквивалент, който да се използва при бебета и да се прилага чрез назогастрална сонда или гастростома. Разработват се и нови медикаменти с не-свински произход, включващи липротамаза, към момента във фаза 3 на проучванията (60). Частично възстановяване на екзокринната панкреасна функция е наблюдавана при лечение с генно-модифицираща терапия при деца.

При проследяване на пациентите с МВ е необходимо редовно отчитане на теглото, хранителния статус, нивата на витамини в кръвта, както оценка на респираторната функция (68). Доказано е, че малнутрицията се асоциира с нарушена белодробна функция, повишен риск от екзацербации, хоспитализации и смърт (152, 266). За превенция на тези усложнения препоръките са за поддържане на индекс на телесна маса (ИТМ) 22 kg/m² за жените и 23 kg/m² за мъжете, както и индекс на стандартно отклонение над 50-ти персентил за деца. Трябва да се има предвид и саркопенията, която представлява загуба на мускулна маса и функция, и е феномен все още недостатъчно проучен при деца с хронични заболявания. При напреднало чернодробно заболяване, както и при CFLD,

саркопенията се асоциира с лоша прогноза (74, 115). В систематичен анализ, който включва четири студии, изследващи телесната маса и композиция чрез методи като двойноенергийна рентгенова абсорбциометрия (DEXA), биоелектричен импеданс или ядрено-магнитен резонанс, 21 от 45 пациенти са имали тежка малнутриция, въпреки че ИТМ е бил над границите за такава (152).

Международните ръководства за хранене на пациенти за МВ препоръчват дневен енергиен внос от 110–200% от дневните нужди, като поне 35–40% са мазнини. Все още голяма част от пациентите са с тежко недохранване. Те могат да преминат на ентерално хранене чрез назогастрална сонда или гастростома (18, 188, 288).

Интестинално заболяване при МВ е мекониум илеуса (МИ), който е първа изява на заболяването при около 20% от пациентите (252). Класифицира се като неусложнен и усложнен. Неусложненият МИ се изявява с тънкочревна дилатация проксимално от обструкцията, а при усложнения са налице волвулус, некроза, атрезия или перфорация на червата с необходимост от спешна хирургична интервенция. Неусложнените форми могат да се повлияят консервативно с приложение на хиперосмоларни клизми с гастрографин или ацетилцистеин. Счита се, че пациентите с МВ и МИ показват тенденция за по-тежко протичане на заболяването в ранна възраст, развитие на постоперативни усложнения, холестаза в кърмаческия период, чести инфекции, малабсорбционен синдром и незадоволителен тегловен прираст, но до момента липсват анализи на големи групи пациенти (185). Най-често наблюдаваните постоперативни усложнения са инфекциозният и малабсорбционният синдром, синдромът на бактериален свръхрастеж и проявите на субилеус/илеус. По-рядко срещани са анемичният синдром, кървене от долните отдели на ГИТ и евагинация на стомата (185).

Синдромът на дистална интестинална обструкция (СДИО) е друга клинична изява, която се развива след периода на новороденото

и засяга 15% от пациентите с МВ и 44–50% от тези с анамнеза за МИ. Задържането на вискозна и гъста фекална маса в чревния лумен на терминалния илеум и цекума водят до частична или пълна обструкция (92). СДИО и МИ са по-чести при мутации от класове I-III. Други рискови фактори за развитието им са панкреасната инсуфициенция, дехидратацията, мастната малабсорбция, предходни епизоди на СДИО, диабет и органна трансплантация. Лечението на СДИО включва адекватен прием на панкреасни ензими, лаксативи и рехидратация (168). Други прояви от страна на ГИТ, свързани с дисмотилитетни прояви, са гастроезофагеалната рефлуксна болест и бактериалния свръхрастеж, които налагат навременно лечение и профилактика.

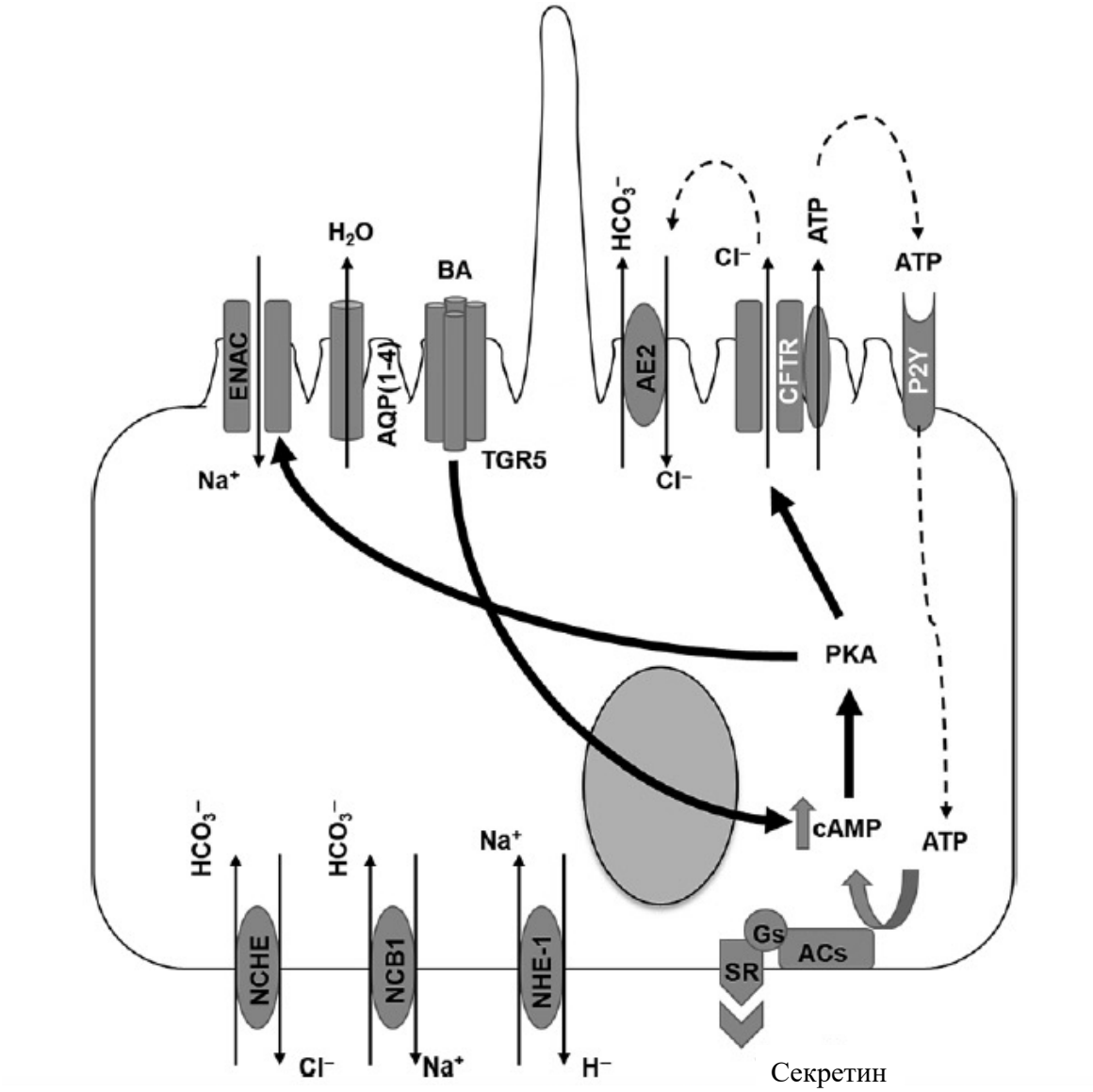
Патофизиологичните механизми на чернодробното увреждане при МВ се проучват активно през последните години (101, 130). То засяга до около 40% от пациентите и включва всички прояви от страна на черния дроб, включително клинични и лабораторни характеристики (57). Те могат да са свързани с различни допълнителни епифеномени, като епизоди на инфекция, лекарствено индуцирана хепатотоксичност, стеатоза с разнообразен произход – диабет, хронична диария, панкреасна недостатъчност, малнутриция или затлъстяване, или чернодробна конгестия с кардио-респираторен произход. Същинското чернодробно увреждане свързано с МВ, а именно CFLD, включва нарушенията обусловени от дефектния CFTR (184).

Холангиоцитите или билиарните епителни клетки (БЕК) са покривния епител на интрахепаталните и екстрахепаталните жлъчни пътища. През последните две десетилетия сме свидетели на значителен напредък в разбирането за функцията и дисфункцията на тези клетки. БЕК са важен фактор в процесите на възстановяване на чернодробната тъкан и играят фундаментална роля в чернодробната имунобиология (151, 158). Холангиоцитите, принадлежащи към

различни отдели на билиарното дърво се характеризират със специализирана морфология и изпълняват различна физиологична функция (172, 197). Най-малките БЕК, очертаващи каналите на Херинг и дисталните клонове, имат кубовидна форма с кръгли базални ядра и бързо реагират на чернодробна или билиарна увреда. Холангиоцитите по хода на големите интра- и екстрахепатални жлъчни пътища са цилиндрични и посредством транспортните си възможности медиират алкализацията, хидратацията и модификацията на жлъчката. И двата вида клетки имат секреторни и абсорбтивни функции, и участват в рециркулацията на жлъчните киселини, глюкозата и водата (62, 71).

Около 40% от жлъчката се образува от БЕК след модификация на първичния продукт на хепатоцита. Посредством комплексна мрежа от помпи и канали жлъчката променя обема си, pH и степента на хидратация. Главна роля в тези процеси има CFTR протеина (Фигура 8) (71). Про-секреторният хормон секретин се свързва с рецептор, стимулира интрацелуларно покачване на нивата на цикличен аденозинмонофосфат (cAMP) и активира CFTR за транспорт на хлорни йони към лумена. При ре-абсорбцията им трансмембранно се транспортира бикарбонат, отговорен за алкализиране на жлъчката (71).

Най-добре проучената функция на холангиоцитите е да модифицират обема, някои физични характеристики и алкалността на първичната жлъчка, която се секретира от хепатоцитите. В допълнение, билиарният епител има потенциала да реабсорбира вода, глюкоза, глутатион, жлъчни киселини и електролити (62). Всъщност, БЕК модифицират състава на първичната жлъчка, секретирана от хепатоцитите в жлъчните каналикули, като до 40% от нея се продуцира от билиарния епител в зависимост от фазите на храносмилане.




Фигура 8 (по Cadamuro M, Fiorotto R, Strazzabosco M, Liver biology and pathobiology. Wiley 2020): Секреция на жлъчка и модификация в холангиоцита.

Промените в обема и състава на жлъчката се модулира от комплексно взаимодействие на различни про-секреторни хормонални и паракринни стимули, като секретин и АТР, както и анти-секреторни фактори, като ендотелин-1, гастрин и соматостатин (71, 139). Тези секреторни и анти-секреторни стимули работят чрез повишаване или намаляване на нивата на клетъчния цикличен аденозинмонофосфат (cAMP) (Фигура 8). Про-секреторните медиатори действат по интегрален механизъм посредством мембранно-свързани или разтворими аденилил циклази (ACs), като

това води до повишаване нивата на интрацелуларен cAMP и активация на протеин-киназа А (PKA) и епителиалния натриев канал ENAC. Активираната PKA стимулира CFTR, който медиира секрецията на хлориди към лумена. Това от своя страна активира апикално разположена независима от натрий помпа за размяна на хлориди и бикарбонати. Концентрацията на аниони в лумена на жлъчните каналчета създава осмотичен градиент, който чрез аквапорин-1 и -4 привлича вода в тях. За поддържане на клетъчната хомеостаза, секрецията на бикарбонат се балансира чрез интрацелуларен внос на аниони през натрий-зависим транспорт на мембраната, както и чрез натриево-бикарбонатен транспортен на базолатералната мембрана на холангиоцитите (279, 280).

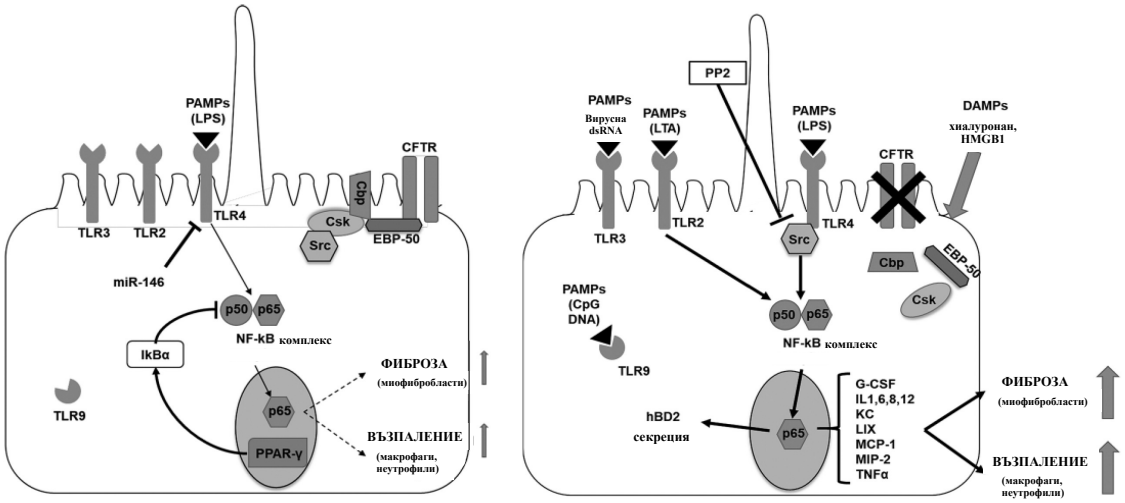
Тези координирани механизми са необходими за повишаване на алкалността и обема на жлъчката, затова нарушенията им водят до патологични състояния. При МВ дисфункционалният CFTR нарушава координираната активация на AE2 и секрецията на бикарбонати и течност към жлъчката. Променението състав на жлъчката предизвиква поредица от събития като формиране на жлъчни тромби и акумулиране на токсини (жлъчни киселини, ендотоксини), които увреждат епитела и причиняват фокално билиарно възпаление, прогресиращо до склерозиращ холангит и евентуално цироза (124).

Освен горепосоченото, бикарбонатната секреция осигурява и важен защитен механизъм от страна на холангиоцитите за протекция от някои токсини в жлъчката, но и чрез действието на неутралните протонизирани хидрофобни жлъчни киселини. Повечето жлъчни киселини са глицин-конюгирани и обикновено са частично протонизирани и неутрални, поради което преминават свободно през мембраната при pH 7.4. Хидрофобните жлъчни киселини обаче акумулират в клетъчната цитолазма и могат да предизвикат клетъчна увреда, включително апоптоза, дори в микромоларни концентрации.

Тези наблюдения водят до хипотезата, че секрецията на бикарбонати извън апикалната мембрана на холангиоцитите създава локален „бикарбонатен щит/чадър“, който предпазва епитела (165, 166). При нормално функциониращи холангиоцити, първичната жлъчна киселина хенодеоксихолева киселина (CDCA) взаимодейства с рецептора TGR5, който е мембранно свързан рецептор, куплиращ се с G-протеин, локализиран на апикалната мембрана. Активацията на TGR5 води до повишавана концентрацията на cAMP и активиране на екскрецията на хлориди, заедно с ATP през CFTR. ATP, освободен в жлъчката, свързва специфичния повърхностен пуринергичен рецептор P2Y2, който увеличава нивата на интрацелуларния калций и стимулира по автокринен път секрецията на хлориди от калций-зависимите хлорни канали. Хлоридите се транспортират обратно в цитоплазмата чрез AE2 помпа. В крайна сметка, действието на алкалните фосфатази, локализирани в апикалния гликокаликс в близост до P2Y рецепторите, осигурява точното количество бикарбонатна секреция чрез деградация на ATP до ADP и AMP (52). Изградена е хипотеза, че дестабилизацията на т. нар. билиарен „бикарбонатен щит“ би могла да доведе до промени в pH на жлъчката, които да нарушат хомеостазата и съответно да тригерират процеси с увреждане на жлъчните пътища – хроничен холангит, фибротични процеси, склерозиращ холангит и други (51, 165).

Скорошни проучвания доказват нова функция на CFTR като регулатор на ендотоксинов толеранс в холангиоцитите, благодарение на взаимодействието с други протеини като Src тирозинкинази и това вероятно ще промени представата ни за CFLD от класическо каналчесто увреждане на черния дроб към възпалително, а вероятно и имуномедиирано, заболяване (137, 140). Извън функцията си да регулира трансмембранния транспорт на хлориди, нови проучвания демонстрират ефекта на CFTR върху активността на toll-like receptor 4 (TLR4). CFTR нормално регулира TLR4 зависимите възпалителни

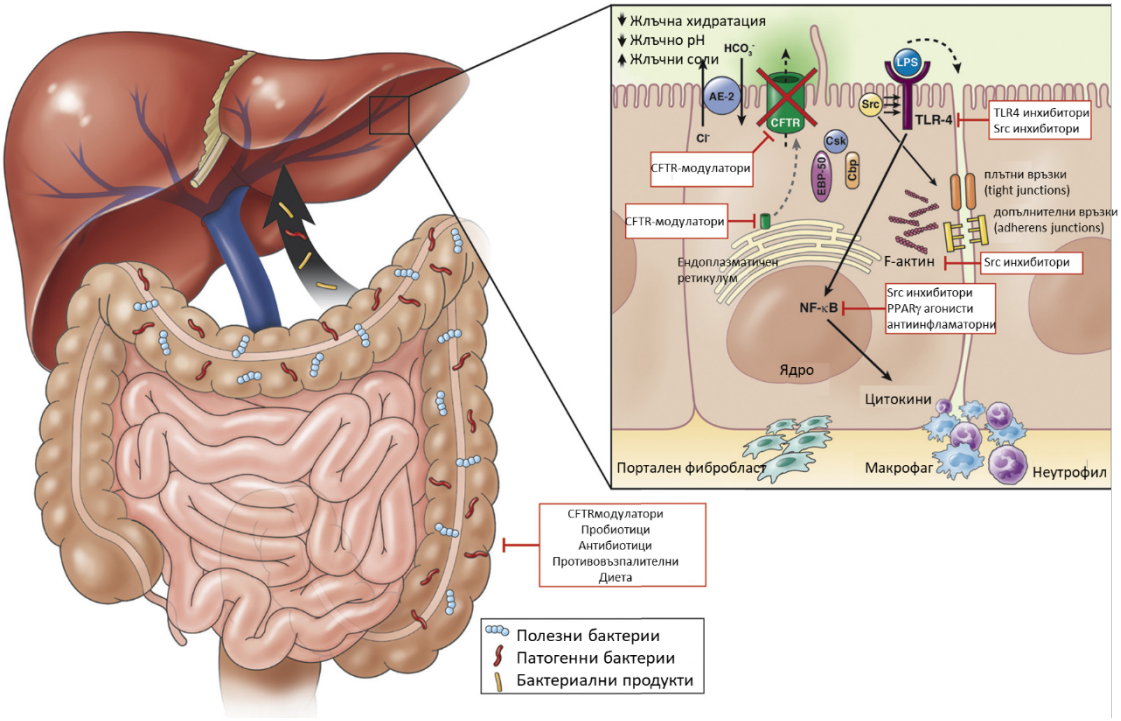
отговори чрез потискане на активността на Rous sarcoma oncogene cellular homolog (Src), който е протеин тирозин киназа без собствен рецептор. Мутации в *CFTR* гена водят до активиране на Src и фосфорилиране на TLR4, водещо до нарушаване на епителната бариера от възпалителни клетки и цитокинова продукция, както и от транслокация на бактерии в порталното кръвообращение, водещо до хронично възпаление и фиброза (Фигура 9) (71). Дисфункцията на CFTR повлиява чревната микробиота, което допълнително води до интестинално възпаление и симбиоза с преобладаващите патогенни бактерии, което допринася за транслокацията им към порталната циркулация (139). Въпреки това, патофизиологичните механизми на ниво чревен микробиом все още не са достатъчно проучени. Нови изследвания идентифицират и друг механизъм на увреждане при нециротичната портална хипертония с фокална нодуларна хиперплазия при възрастни пациенти (301).




Фигура 9 (по Cadamuro M, Fiorotto R, Strazzabosco M, Liver biology and pathobiology. Wiley 2020): Секреция на жлъчка и модификация в холангиоцита.

Описаните механизми подпомагат научните търсения в посока на развитие на нови терапевтични таргети за CFLD. Остава предизвикателството да се валидират подходящи експериментални модели (126, 139, 276). Fiorotto R, et al. (2018) проучват инхибирането

на Src тирозинкиназа, което намалява възпалителните и морфологични промени на цитоскелета при човешки холангиоцити с мутация F508del и подобрява ефективността на прилагания CFTR модулатор (136).




Фигура 10 (по Fiorotto R, et al *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;8(2):197-207): Патогенетични механизми при CFLD и потенциални терапевтични възможности.

Засягането на жлъчния мехур при МВ е познато отдавна. То може да включва малък/хипопластичен или липсващ жлъчен мехур, дисфункционален жлъчен мехур, симптоматична холестаза при кърмачета или по-големи деца и възрастни, холелитиаза, както и малигнени заболявания (44). Начални описания на патоанатомични находки при МВ още от 1960 година показват контрахиран мехур, мрежовидни лезии в лумена, сгъстена жлъчка, ахолични плътни секрети и конкременти, възпалителни инфилтрати и други (127, 128). Някои автори съобщават за ползата от ехографското изследване за пренатално установяване на патология на жлъчния мехур като

скрининг за МВ (113). Холелитиазата се среща сравнително често при пациенти с МВ. Първоначално се е считало, че стеаторея та и малабсорбцията при МВ биха довели до развитие на конкременти, поради загубата на жлъчни киселини с изпражненията, което води до литогенна жлъчка и холестеролови отлагания. Но при МВ по-често се наблюдават черни/тъмни конкременти, които се свързват с допълнителна ацидификация на жлъчката, вследствие нарушеното функциониране на CFTR. В допълнение, билиарната стаза и наличието на промени в мехура с/без стриктури, създават среда за утаяване и формиране на конкременти. Симптоматичните пациенти се насочват за хирургично лечение, като холецистектомия се съобщава в до 4% от засегнатите (96).

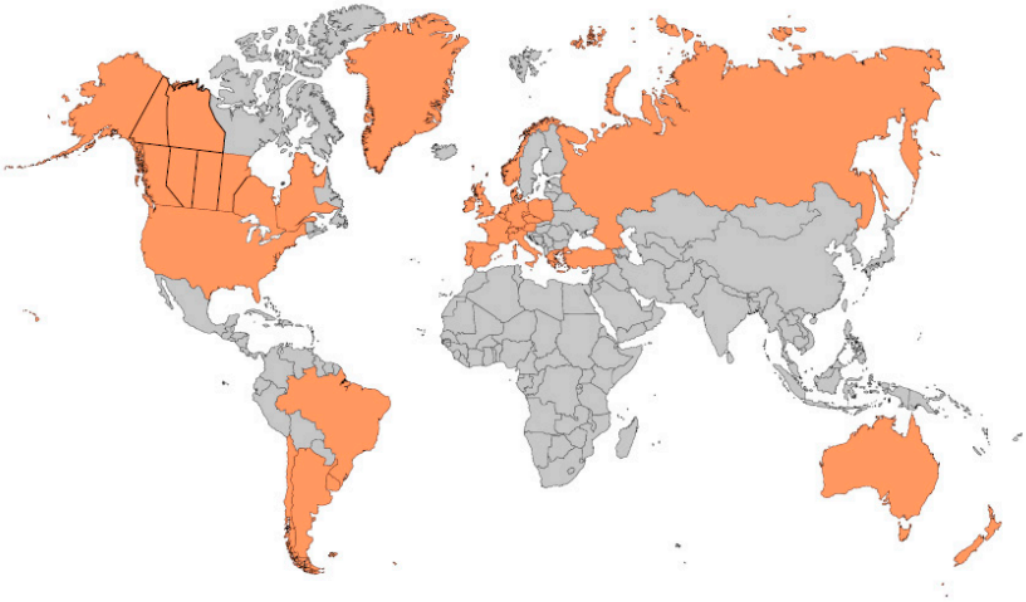
## 2.5. ДИАГНОЗА

През 2017 година Cystic Fibrosis Foundation в международна колаборация публикува нов вариант на препоръките за диагностика на МВ (The Journal of Pediatrics 2017) (135). За региони без неонатална скринингова програма диагностични критерии са клиничната картина, анамнезата за фамилност с данни за CFTR дисфункция или фамилност с доказване на две мутации, причиняващи заболяване. Основен метод за потвърждаване на диагнозата е потният тест. Ранната диагноза е от изключителна важност за пациентите с МВ с оглед ранно започване на лечение и предотвратяване на усложнения.

### 2.5.1. НЕОНАТАЛЕН СКРИНИНГ

Първите опити за ранно диагностициране на МВ датират от седемдесетте години на миналия век с т. нар мекониум тест (69), но едва близо десетилетие по-късно в Нова Зеландия започва тестуване в суха

капка кръв от новородени за имунореактивен трипсиноген (IRT) (95). С множество проучвания се достига до заключението, че този скрининг с една проба IRT е недостатъчен и се пристъпва към двустъпален модел за скрининг, а именно с изследване на втора проба след две седмици отново на IRT. Въпреки подобрения вариант, все още не се получават надеждни данни за точно разделяне на болни от здрави новородени с чувствителност на метода между 75 и 80% (179). Тези първоначални опити за скрининг претърпяват временен неуспех, забавяйки въвеждането му с няколко десетилетия (98).



Фигура 11 (по Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. *Int J Neonatal Screen.* 2020;6(1):18): Страните в оранжево са с въведен национален скрининг на новородени за МВ – данни за 2020 година.

Няколко години след откриването на *CFTR* гена и генотипизирането на пациентите се започва отново опит за скрининг, който включва IRT в първа стъпка и ДНК анализ във втора стъпка с изследване на по-честите мутации в дадена популация (154). Друга алтернатива на ДНК изследването, с цел избягване идентифицирането на носителите като болни, е използването на панкреас-асоцииран протеин (PAP) във втората стъпка (267).

Благодарение на тези стъпки масов неонатален скрининг е въведен вече в много държави (Фигура 11), който е с 98% откриваемост на заболяването още в първия месец на живота, при около 5% фалшиво положителни резултати (257). Доказано е, че още в първите дни може да настъпи тежка малнутриция, а белодробно увреждане – за няколко седмици при децата с МВ, които се диагностицират на база клинични симптоми (33). Бебетата с висок риск от неонаталния скрининг за МВ се насочват към специализирани центрове, където след като диагнозата бъде потвърдена, обикновено през първите 4 до 6 седмици от живота се започва системна терапия (134). Чрез възможност за ранна и пълноценна интервенция скринингът обуславя по-дълга продължителност и по-добро качество на живота (133, 155, 198).

През последните години с навлизането на CFTR модулаторите все повече страни залагат на схемата IRT/ДНК за най-чести мутации за популацията, а някои държави като Полша, дори са въвели пълно секвениране на *CFTR* гена като втора стъпка.

В нашата страна неонатален скрининг за МВ бе заложен в програмата за Майчино и детско здравеопазване 2015-2020 година на Министерство на здравеопазването, но се обсъжда въвеждането му в България за следващия програмен период.

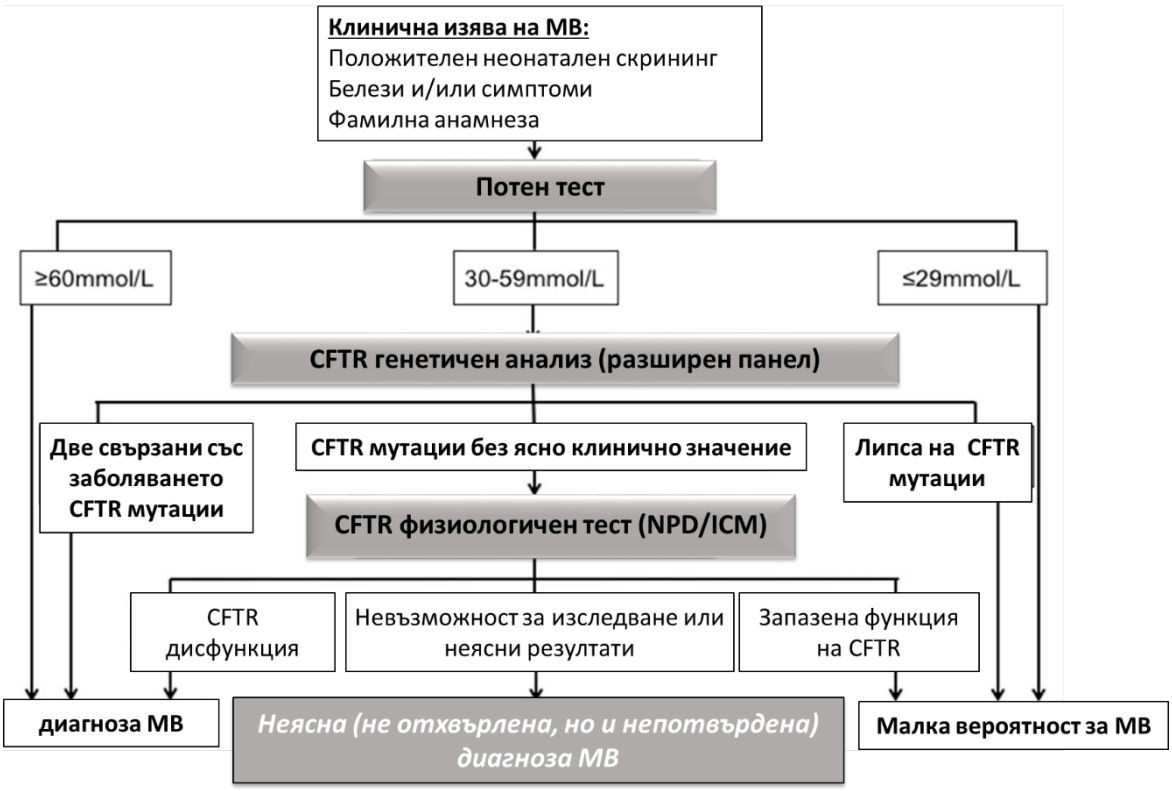
### 2.5.2. ДИАГНОСТИЧНИ КРИТЕРИИ

Потният тест, проведен в референтна лаборатория, остава златен стандарт в диагностиката на МВ. Измерва се количеството хлориди в потта, събрана при спонтанно потоотделяне или стимулирано чрез прилагане на нисковолтов ток към поставения върху кожата пилокарпин. Концентрации на измерения хлор над 60 mmol/L са диагностични, концентрации 30–59 mmol/L са междинни

и налагат повторение, а концентрации под 30 mmol/L са приемат за нормални – отрицателен потен тест (135).

Генетичните методи целят определяне на мутациите в *CFTR* и включват секвениране по Сангер, секвениране от ново поколение, геномно секвениране, както и multiplex ligation-dependent probe amplificiation (MLPA) анализ.

Предложен е алгоритъм на диагностициране, който улеснява процеса и ограничава пропуските (Фигура 12) (135).




Фигура 12 (адаптирано по Farrell PM et al. *J Pediatr* 2017;181:S4–15): Диагностичен алгоритъм за МВ.

Описани са и състояния, при които диагнозата остава непотвърдена, а именно МВ с положителен резултат от скрининга (Европейска терминология) или CFTR-свързан метаболитен синдром (Северно-Американска терминология). Това са деца с хипертрипсинемия при неонаталния скрининг, които не изпълняват критериите за заболяването и са клинично здрави (211, 241). Най-

честата причина за това е наличието на един или повече *CFTR* варианти с неясно клинично значение. Кърмачета с такава находка имат резултат от потния тест под 30 ммол/л и два *CFTR* варианта или потен тест в гранични концентрация 30–59 ммол/л с липса или наличие само на една *CFTR* мутация или един вариант с неясно клинично значение (271). Повечето деца с този синдром няма да развият биохимични промени или характерна клинична картина, но е необходимо да бъдат проследявани през юношеството и като възрастни (261).

От друга страна, CFTR-свързаните заболявания (58) са такива с ясно клинично засягане на определени органи и с наличие на CFTR дисфункция, но без да покриват критериите за заболяването МВ. Наличието на *CFTR* хетерозиготност при състояния като вродена билатерална липса на семепровода, рецидивиращ панкреатит, бронхиектазии, астма и други, вероятно насочват към неразпознати функции на CFTR и отражението на допълнително не-*CFTR* генетични и епигенетични фактори, както и влияние на средата, които следва да бъдат проучени (78, 204).

## 2.6. КЛИНИЧНА ИЗЯВА И КОНВЕНЦИОНАЛНА ТЕРАПИЯ

През последните десетилетия преживяемостта на пациентите с МВ значително се подобри благодарение на новите терапевтични режими, включително използването на генно-модифицираща терапия. От друга страна обаче, поради подобреното лечение и удължената продължителност на живот все повече “необичайни” за МВ клинични изяви се срещат при пациентите – напр. бъбречно засягане (Таблица 3) (240, 261). В различни литературни източници се съобщава, че пациентите с МВ показват забавено пубертетно развитие и изоставане в растежа като повечето автори считат, че тези процеси са пряко свързани с малнутрицията и тежестта на

белодробното засягане (54). Клиничната изява остава изключително хетерогенна.

| Засегнати органи | Клинична изява на МВ | Усложнения |
|---|---|---|
| **Бели дробове** | Рецидивиращи бактериални и гъбични инфекции, бронхиектазии, пневмоторакс, хемоптиза, ДН | Инфекция с мултирезистентни микроорганизми |
| **ГДП** | Хроничен синуит, назални полипи | - |
| **Панкреас** | Панкреасна деструкция, панкреасна недостатъчност, панкреатит | - |
| **Черен дроб** | Неонатална жълтеница, CFLD, стеатоза, цироза, холелитиаза | Медикаментозно чернодробно увреждане |
| **ГИТ** | МИ, СДИО, малнутриция, дислипидемия | Затлъстяване и рак |
| **Бъбреци** | Нефролитиаза | Бъбречна недостатъчност |
| **Мускулно-скелетни** | - | Остеопороза, остеопения, артропатия, мускулна дисфункция |
| **Гениталии** | Мъже: Вродена двустранна липса на vas deferens, азооспермия, безплодие<br><br>Жени: Патология на цервикалния мукус | -<br><br>Намален фертилитет и уринарна инконтиненция |
| **Ендокринни жлези** | Диабет | Абнормности в репродуктивните хормони |
| **Потни жлези/Кожа** | Хипохлоремична метаболитна алкалоза, дехидратация/палмоплантарна кератодерма | - |

Таблица 3 (модифицирано по Shteinberg M et al, *Lancet* 2021;397:2195–211): Клинична изява при МВ.

Белодробното увреждане, което е причина за смъртност в 85% от случаите, започва от ранна възраст и се характеризира с нарушен мукоцилиарен клирънс и последващо хронично възпаление на дихателните пътища и хронична бактериална инфекция. Основен симптом е диспнеята, която освен допринасящ фактор за повишена заболеваемост, необходимост от хоспитализации и лошо качество на живот, също така е и важен прогностичен показател за смъртността (37, 124). Налице е изразена бронхиална обструкция, която се свързва със стеснения лумен на бронхите в резултат на подлежащо възпаление и натрупване на гъст, вискозен секрет. Ето защо един от най-обективните маркери за изследване на белодробната функция при пациентите с МВ е определянето на процент прогнозиран форсиран експираторен обем за една секунда (FEV1). FEV1 е установен и потвърден маркер за прогресия на заболяването и корелира с преживяемостта при пациентите (124, 261). Влошаването на белодробната функция повишава риска от белодробни екзацербации, които от своя страна са свързани с прогресия на белодробното увреждане, по-висок риск от смърт или необходимост от белодробна трансплантация. Счита се, че половината от понижението на белодробната функция при пациентите се дължи на белодробни екзацербации. Следователно лечението, насочено към подлежащата причина за заболяването, е важно и има потенциал за модифициране прогресията на МВ (80, 205).

Основна цел на лечението при пациенти с МВ е максималното отлагане на началото на белодробните инфекции, активен мониториг за колонизация, навременно лечение и опити за ерадикация, както и оптимален хранителен режим, профилактика и лечение на малнутрицията (18, 24, 288). От практическа гледна точка за пациентите това означава ежедневен режим, оценка на здравния статус на всеки три месеца, строго проследяване на теглото, белодробната функция и микробиологично изследване (124).

В белите дробове на пациентите с МВ се откриват малък брой патогени, първоначално *Staphylococcus aureus* и *Haemophillus influenzae*, последвани от хронична колонизация с *Pseudomonas aeruginosa*. За лечение се използват перорални антибиотични курсове с продължителност 2-4 седмици, а за по-тежки инфекции се налага и интравенозно приложение. Хроничната инфекция с *Pseudomonas aeruginosa* се свързва с по-бърза прогресия на заболяването и влошаване на белодробната функция (142, 287).

Инхалаторната терапия е важен елемент от лечението при пациентите с МВ. Тя включва мукоактивни субстанции, какъвто е хипертоничният разтвор на натриев хлорид, за подобрение на клирънса на дихателните пътища и намаляване вискозността на храчките, и муколитици – небулизирана човешка дорназа алфа (ДН-аза) (250). Инхалаторните антибиотични курсове се добавят с цел предпазване от екзацербации. С това се подобрява поддържането на дихателните пътища максимално очистени от гъстите секрети. Нерешен остава въпросът кога точно трябва да започнат на тези терапии, като за инхалаторните антибиотици се приема момента на инфектиране с *Pseudomonas aeruginosa* (3). Макролидният представител азитромицин е с доказан анти-инфламаторен ефект и подобрява белодробната функция, дори и преди да се наблюдава инфекция *Pseudomonas aeruginosa*.

Друг неизменен компонент от ежедневното лечение е физиотерапията. През годините са изработени много техники, които се прилагат индивидуално според пациента (29).

От белодробните усложнения ателектаза се установява при 5 до 50 % от пациентите, пневмоторакс в 5-8 % при пациентите в детска възраст и достига до 16-19 % при възрастните (9, 22). Все по-чест и сериозен проблем при тези пациенти е и алергичната бронхопулмонална аспергилоза в 1-23 % от пациентите, която се подозира при поява на еозинофилия и силно повишаване на

серумните IgE нива над 1000 ng/mL (169). Инфекциите с нетуберкулозни микобактери са редки, но не трябва да се подценяват. Белодробни кръвоизливи са наблюдавани при около 10% от пациентите над 18 години. Кръвоизливите и пневмотораксът са спешни състояния, налагащи хоспитализация и интензивен мониторинг (11). Образните изследвания подпомагат навременната диагноза и съответните терапевтични решения (1).

При спадане на стойностите за FEV1 под 30% от предвидените и трайно задържане на PaO2 <55mmHg и PaCO2 >50mmHg, пациентите се класифицират в т.нар. „крайна фаза на белодробно засягане" (при тези показатели 50% от пациентите умират до 2 години) (12). Достигнали тази фаза те стават кандидати за белодробна трансплантация, която не е дефинитивно лечение, а е средство за удължаване на живота. За съжаление повече от половината пациенти умират докато чакат своя ред за трансплантация (109).

При напредналите форми на болестта пациентите имат необходимост от скъпа терапия с инхалаторни антибиотици, инхалаторни муколитици, кислород, а в някои случаи и от постоянна доставка на кислородни бутилки у дома, централни венозни пътища с устройства за интермитиращи инфузии на антибиотици, хранително подпомагане, понякога чрез сондово хранене, приложение на инсулин, хепатопротектори, имуносупресанти (при преживяна чернодробна или белодробна трансплантация) (5). Острите екзацербации при МВ се характеризират с внезапно влошаване на респираторните симптоми, придружено от хипоксемия, поява на нови рентгенографски инфилтрати и нужда от продължителен болничен престой (80, 261). Именно пациентите в тежко състояние са рискови по отношение на насложени вирусни инфекции с предимно белодробно засягане (16).

С удължаване живота на пациентите с МВ се появяват нови проблеми и нозологични единици (Таблица 3) (261). Такъв пример е

захарният диабет, свързан с МВ, който се наблюдава при 50% от пациентите над 18 години. Този тип диабет води не само до изявената клинична картина и усложнения от микро- и макроангиопатията, но също така е свързан и с ускорен спад на белодробните функционални възможности. Съвременната практика е да се скринират пациентите за изменения в глюкозния толеранс чрез регулярни измервания на серумна глюкоза на гладно, измерване на нивата на глюкозата при орално натоварване с глюкоза и определяне на HbA1C. Лечението е изключително и само с инсулин, като не се препоръчва рестрикция на храната (65, 261).

Друг проблем е костната болест, свързана с МВ. Фрактурите при жени над 16 години са 2 пъти по-високи при популацията от пациенти с МВ, в сравнение с общата популация. Същата е и ситуацията при пациентите мъже над 25 годишна възраст. За поддържане на оптимално костно здраве се предписват витамини Д и Е, и се препоръчва повишаване приема на калций, за да се постигне оптимална телесна маса и контрол на белодробните инфекции (22, 161).

## 2.7. ЧЕРНОДРОБНО УВРЕЖДАНЕ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗА

Чернодробното увреждане при МВ (Cystic fibrosis-related liver disease (CFLD) е една от водещите причини за смъртност, въпреки че тежките форми рядко се изявяват преди пубертета. След кардио-респираторните проблеми и трансплантационните усложнения, чернодробното заболяване е трета водеща причина за смърт, отговаряща за 2.5% от общата смъртност при МВ (10, 13). CFLD всъщност е независим рисков фактор за смъртност и увеличен ресурс на системите на здравеопазване при пациентите с МВ (284). CFLD се определя от патогенезата, свързана с подлежащите нарушения на CFTR на ниво холангиоцити (138, 139). Морфологичните промени и

клиничната изява са разнообразни, като основна хистологична характеристика остава фокалната билиарна фиброза, която най-често е безсимптомна. В черния дроб е налице хипервискозитет на жлъчката, обструкция на жлъчните канали, възпалителни промени и фокална фиброза. Порталната хипертония (ПХ), като усложнение на билиарната цироза или в резултат на порто-синусоидална съдова болест, играе важна роля в прогресията на чернодробното увреждане, малнутрицията, инфекциозните усложнения и смъртността при CFLD (67, 101).

Чернодробното увреждане, което се докладва при около 40% от пациентите с МВ включва всички чернодробни клинични прояви, доказани посредством клинични, лабораторни (биохимични) и образни методи. Те могат да са свързани с различни допълнителни фактори като чести инфекциозни епизоди или лекарствена хепатотоксичност, стеатоза с различен произход – диабет, хронична диария, панкреасна инсуфициенция, малнутриция и затлъстяване, или с чернодробна конгестия от кардиопулмонален произход. Ето защо чернодробното увреждане не винаги е пряко свързано с МВ – CFLD, зависещо от CFTR дисфункционалността (47). Патогенетичните механизми все още остават недобре проучени, поради което фенотипната класификация е по-използвана и удобна за практиката. Според Северноамериканското и Европейското дружество по детска гастроентерология, хепатология и хранене (NASPGHAN, ESPGHAN) се различават мултилобуларна цироза с/без портална хипертония или чернодробна недостатъчност, както и чернодробно засягане с/без портална хипертония.

Макар и срещащо се в близо 40% от пациентите и клинично проявено едва в 5-10%, CFLD се наблюдава преди всичко при пациенти с мутации от клас I, II, III и VI, или т. нар. „тежко протичаща“ МВ (200). До този момент не са доказани ясни корелации между генотип и фенотип и не се знае защо някои болни развиват чернодробни изменения, а други

със същия генотип – не (300). Проучване на Sakhuja S et al. (2023) посочва, че средно тежкото белодробно засягане в комбинация с повишени чернодробни ензими при поставяне на диагнозата се асоциират с по-бърза прогресия на CFLD (251).

Около 20% от пациентите са с данни за хронично чернодробно засягане, а 6-8% са с цироза. CFLD е независим рисков фактор за смърт (3 пъти по-голям риск при наличието CFLD, p=0.02) и причина за около 2% смъртност при МВ (247). Честотата на CFLD зачестява през последните години може би и заради по-добрия скрининг още от ранна възраст. При почти всички пациенти с CFLD измененията във функцията и структурата на черния дроб се проявяват преди 20 годишна възраст (278). Интересно откритие е, че пациентите при които има по-лека клинична изява и частично запазена функция на CFTR (мутации от класовете IV и V), и които нямат изявена панкреасна инсуфициенция, почти нямат чернодробно засягане. От друга страна, наличието на мекониум илеус увеличава риска за развитие на CFLD 5 пъти (91). На таблица 4 е представена клиничната изява на CFLD и съответната честота сред популацията (Таблица 4) (187, 219).

| **Състояние** | **Честота** |
|---|---|
| Фокална билиарна фиброза | 20-30% |
| Мултилобуларна билиарна цироза | 5-15% |
| Портална хипертония | 2-5% |
| Малък (хипопластичен) жлъчен мехур | 15-45% |
| Холелитиаза | 3-25% |
| Неонатална холестаза | <10% |
| Склерозиращ холангит | рядко |
| Холангиокарцином | рядко |

Таблица 4. Клинична изява при CFLD.

Патофизиологичните механизми при МВ бяха подробно разгледани по-горе. Генетично определената дисфункция на CFTR води до абнормна секреция в жлъчните пътища, която е причина за сгъстена жлъчка с променени характеристики. Резултатът е обструкция на жлъчните пътища, инфекции и развитие на възпалителен отговор. Под влияние на модифициращи гени, имунният отговор и задръжката на хидрофобна жлъчка водят до развитие на фокална (огнищна) билиарна фиброза и цироза (7, 106, 107). Проучвана е ролята на *SERPINA1*, генът за алфа-1 антитрипсиновия дефицит, но мутациите в него рядко се описват при пациенти с МВ (47). Описват се и съдови промени, както и повишена интестинална пропускливост, която води до абсорбция на патоген-асоциирани молекули, които стимулират възпалението и фиброзата (101, 171). Посочената последователност от събития, свързани с обструкция на жлъчните пътища, водеща до фокална фиброза и цироза с развитие на портална хипертония през 2017 година е подложена на съмнение, поради данните, че за пациентите с МВ е характерна и портална хипертония без холестаза и съхранена чернодробна функция. Изказано е предположение за съдовия характер на измененията, като чернодробна цироза се установява в хистологичен материал само в 27% от случаите с портална хипертония (301). Друга теория за възникването на портална хипертония и цироза акцентира на повишената интестинална пропускливост, която води до абсорбция на патоген асоциирани молекули, които стимулират възпалението и фиброзата (42, 178, 214, 219, 229). Особено внимание през последните години се обръща на чревната дисбиоза, свързана с МВ. Тя се характеризира с намалено разнообразие на наличните щамове при пациенти с МВ, както и при напреднало чернодробно увреждане, увеличаване на бактериите, които се асоциират с про-инфламаторен потенциал, както и намаляване на т. нар. протективни щамове. Проучва се и ролята на новите терапии с CFTRm, но все още данните са ограничени (72).

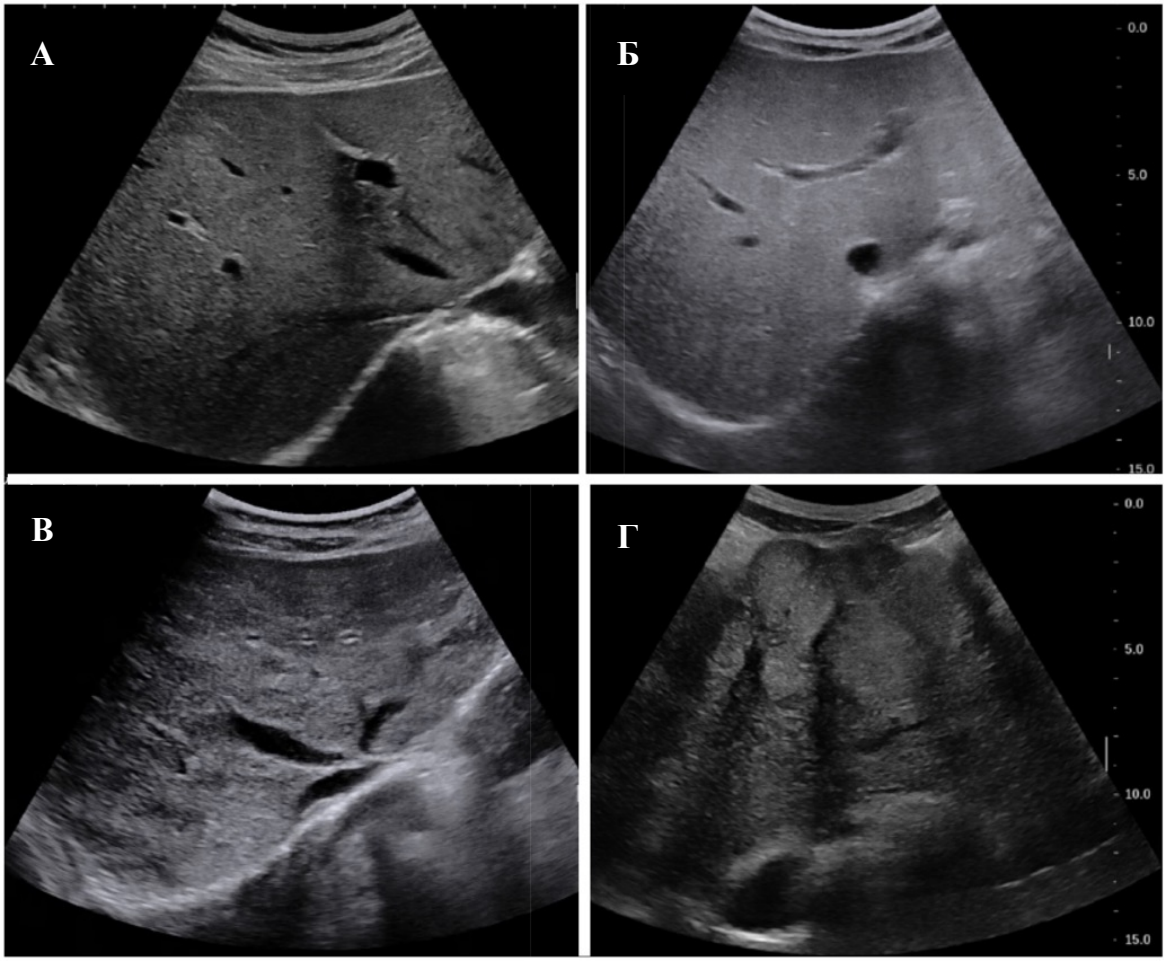
Не-циротична портална хипертония се среща сравнително често при пациентите с CFLD, предимно при млади възрастни. В основата й стои облитеративната портална венопатия, като промените са в порталните пространства с развитие на тромбоза, фиброза и склероза на клоновете на порталната вена (303). Допълнителни фактори са рецидивиращите бактериални инфекции, приемът на различни медикаменти и нарушения имунен отговор (259). Терапевтичният подход е различен, тъй като функцията на черния дроб се запазва дълго време, но са налице хиперспленизъм, варици на хранопровода и асцит.

По отношение диагностиката на CFLD в много центрове все още се разчита на клиничните критерии (55, 107). За наличие на CFLD при пациентите с МВ са необходими поне 2 от следните осем нарушения:

1. Абнормна ехогенност на черния дроб и спленомегалия
2. Спленомегалия с/без хепатомегалия
3. Тромбоцитопения в рамките на хиперспленизъм
4. Леко повишени АСАТ и ГГТ, като се има предвид и приема на лекарства
5. Жълтеница при напреднало заболяване
6. Нарушена синтетична функция на черния дроб (удължено протромбиново време и/или намален серумен албумин), която може да е резултат от напреднало заболяване, както и от малабсорбция на витамин К (за коагулационните нарушения)
7. Влошен хранителен статус и данни за малнутриция
8. Влошена белодробна функция, свързана с повдигане на диафрагмата и вентилационно-перфузионни нарушения.

Ехографското изследване на хепатобилиарната система с Доплер измерване на хепаталния кръвоток е удобен, достъпен, неинвазивен и достоверен скриниращ метод при пациенти с МВ. Чрез него може да се установи фокална билиарна фиброза, мултинодуларна цироза, стеатоза, нарушения по хода на жлъчните пътища, наличие на конкременти в

жлъчния мехур, както и да се идентифицира портална хипертония (107, 289). Абнормната ехогенност на черния дроб много често предшества клиничната и биохимична изява на чернодробното увреждане (298).




Снимка 1 (по Dana J et al. *J Hepatol.* 2022 Feb;76(2):420-434): Ехографско изследване на черния дроб при МВ: А. Нормален образ, Б. Хомогенен хиперехогенен черен дроб, В. Хетерогенен черен дроб, Г. Нодуларен образ.

Ехографията има основно място и при проследяване на пациенти с CFLD, което включва мониториране прогресията на чернодробното увреждане, установяване на напреднала портална хипертония и краен стадий на чернодробно заболяване (Снимка 1) (101). Трябва да се има предвид, че нормалният ехографски образ не изключва наличие на фибротични промени (209, 298). В допълнение, при все повече възрастни пациенти с МВ, ехографията служи и за скриниране за туморни процеси,

които могат да възникнат при хроничното увреждане на панкреаса, жлъчните пътища и черния дроб – холангиокарцином и хепатоцелуларен карцином (259).

Чернодробната биопсия с хистологично изследване, която е златен стандарт при редица чернодробни заболявания, за съжаление не е подходяща за пациентите с CFLD, поради хетерогенния характер на увреждането със зони на запазен паренхим и такива с вече засегнат от фибротичните процеси. Ето защо чернодробната биопсия при пациенти с МВ не се прилага рутинно в повечето центрове (107).

Неинвазивните маркери за чернодробна фиброза, както и образните техники за ранно диагностициране на фиброзата, се проучват много активно при пациенти с МВ (196, 274). Критериите за CFLD на Debray D et al. (2011) включват различни неинвазивни диагностични методи – физикален преглед, биохимични показатели, ехографско изследване, и само в отделни случаи провеждане на чернодробна биопсия (107). Colombo et al. (2002) предлагат критерии, които се основават на същите диагностични алгоритми, но не включват чернодробната биопсия (91). През 2017 година Koh et al. разработват нови критерии за CFLD с участието на еластография и неинвазивни маркери за фиброза, но без физикалния статус, като провеждат сравнителен анализ спрямо критериите на Debray D et al. от 2011 година (181). Те демонстрират, че предложената система, включваща рутинните серумни биохимични тестове, ехографското изследване, еластографията и неинвазивните маркери за фиброза, може успешно да идентифицира пациенти с CFLD и при възрастните, като са диагностицирани допълнително 25% засегнати.

Проучване от Дания от 2020 година скринира болни с МВ за CFLD. Включени са 84 пациента, изследвани физикално, чрез биохимични маркери, проведена е еластография и конвенционална ехография на черния дроб. Резултатите показват, че 9.5% са с CFLD, като е намерена зависимост при използването на еластографията като метод (167).

Биомаркери като тъканния инхибитор на матриксна металопротеиназа (TIMP)-1, колаген IV и пролилхидроксилаза биха могли да бъдат индикатори за чернодробна фиброгенеза при МВ, както и ранни маркери за CFLD, за които предстои да се натрупат повече данни (225). Транзиторната еластография и магнитно резонансната еластография са валидирани за оценка на фиброзата при някои чернодробни заболявания, за които се натрупват все повече данни и при пациентите с МВ (47, 107, 289).

Компютърната и магнитнорезонансната томография могат да се използват за оценка на фокални лезии (фокална стеатоза, хемангиом, фокална нодуларна хиперплазия и карцином), както и за диференциране на фиброза от стеатоза. Магнитнорезонансната холангиография все повече навлиза като метод и в педиатричната популация за ранно диагностициране на увреждане на билиарния тракт, особено при симптоматични пациенти с иктер и коремна болка. Така ендоскопската ретроградна холангиография остава на по-заден план и предимно като терапевтичен метод, поради по-високия риск (114).

По отношение на диференциалната диагноза трябва да се има предвид неалкохолната мастна чернодробна болест, както и склерозиращия холангит, някои автоимунни заболявания и други, протичащи с хронично чернодробно увреждане (274).

Терапевтичната стратегия при пациенти с CFLD се основава на ранна профилактика, медикаментозно лечение и овладяване на усложненията, и трябва да се провежда от експертен мултидисциплинарен екип (265, 273). Медикамент на избор с доказан ефект от множество клинични проучвания и наблюдения е урсодеоксихолевата киселина в доза 20-30 мг/кг/ден, която повишава жлъчния ток, действа като хепатоцитен протектор за тези пациенти и намалява прогресивния ход на чернодробните изменения при редовен прием. Подозира се, че има и имунологична активност (53). През 2017

година Cheng et al. провеждат анализ в рамките на базата данни Cochrane и идентифицират 12 проучвания, като дозата на урсодеоксихолевата киселина е 10-20 мг/кг/ден за период до 12 месеца (81). Анализът включва само част от участниците в проучванията, поради различните методики на някои от тях, като не установява сигнификантна разлика по отношение промяната на теглото, а подобрение в билиарната екскреция се потвърждава само в едно от проучванията. Данните от този анализ са недостатъчни, за да заключат за ползата от приложението на медикамента.

От съществено значение е и строгото проследяване за портална хипертония и лечение на последиците ѝ, избягването на алкохолната консумация, оптимизиране на хранителния режим и калорийния внос, прецизиране приема на антимикотици, азитромицин и рифампицин, приложение на високи дози витамин А (5,000–15,000 IU дневно), витамин Е (100–500 mg дневно) и витамин D (50 ng/kg до максимум 1 μg) с ежегоден контрол на нивата им. При удължено протромбиново време трябва заместително да се включи и витамин К (1–10 mg дневно). Желателно е да се проведат имунизации срещу хепатити А и В. При напредналите форми на CFLD и развитие на краен стадий чернодробно заболяване пациентите трябва своевременно да бъдат насочвани към център за чернодробната трансплантация с опит при пациенти с МВ (114, 122).

При напреднала портална хипертония и наличие на варици на хранопровода се прилага фиброгастроскопия с лигиране на вариците, по-рядко склеротерапия при по-малки пациенти, за която има докладван успех в 86% (67, 177). Приложението на неселективни бета-блокери е спорно, поради изразената бронхиална обструкция при тези пациенти. Хирургичната терапия включва поставяне на портосистемен шънт в случаите с напреднала портална хипертония с висок риск от кръвоизлив или варици, неповлияни от ендоскопските процедури. Друга опция е

трансюгуларния интрахепатален портосистемен шънт (TIPS – transjugular intrahepatic portosystemic shunt) при кървене от варици, рефрактерни на ендоскопско лечение, който е ефективен в около 90% от случаите и може да бъде използван като мост към трансплантация (162, 228). Портосистемният шънт може да отключи или да влоши чернодробна енцефалопатия, както и да се усложни поради възникване на тромбоза или оклузия. Необходим е стриктен и редовен ехографски контрол.

При изследване от 2016 година на Stonebreaker et al. върху 561 пациента (63% мъжки пол, 99% са панкреасно инсуфициенци) с CFLD и портална хипертония се установява, че момчетата се диагностицират средно една година по-рано (10 г.) от момичетата ($p<0.01$) (278). Освен това 99% са със спленомегалия, 71% с варици и 70% с тромбоцитопения. Същевременно трансаминазите на пациентие са били почти нормални. Авторите потвърждават данните, че тромбоцитопения с или без левкопения може да бъде първи белег на цироза (278).

Чернодробната енцефалопатия е рядко усложнение при CFLD. Тя често е резултат от инфекции, свръх внос на протеини или кървене от гастроинтестиналният тракт. Ето защо е много важен правилния хранителен режим за тези пациенти, както и предпазването им от свръх катаболизъм. Взима се под внимание и при оценка за трансплантация.

Хепатопулмоналният синдром се дефинира от триадата чернодробно заболяване, нарушена оксигенация и интрапулмонални съдови аномалии. Описван е изключително рядко при МВ. Подозира се при значимо спадане на кислородната сатурация с поне 5% при изправено положение. Тъй като е често срещан при пациентите с портална хипертония, а 2-8% от пациентите с МВ са с портална хипертония се предполага, че хепатопулмоналния синдром е недиагностициран при тези пациенти (66). Лечението му е чрез чернодробна трансплантация.

Показанията за насочване за чернодробна трансплантация при пациенти с CFLD включват:

1. краен стадий на чернодробно заболяване, неотговарящо на лечение
2. наличие на жълтеница и/или асцит
3. наличие на кръвоизлив от вариците
4. развитие на хепатопулмонален синдром
5. тежка малнутриция, неотговаряща на хранителното подпомагане
6. нарушено качество на живот
7. нарушена белодробна функция

Възможна е трансплантация на черен дроб, както и комбинирана, но през последните години решението за извършаване на трансплантация черен дроб/бял дроб е все по-комплексно и трудно, поради лошите резултати. Положителните ефекти от чернодробната трансплантация върху белите дробове се дължи на три механизма: намаляване размера на слезката и съответно натиска върху диафрагмата, намаляване на сърдечното следнатоварване и намаляване на шънта през белодробната циркулация (183). След чернодробна трансплантация 5-годишната преживяемост при деца и възрастни с МВ е съответно 85% и 72% (202).

## 2.9. ГЕННО-МОДИФИЦИРАЩА ТЕРАПИЯ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗА

Разработките през последните години доведоха до създаване на т. нар. генно-модифициращa терапия при МВ. Всъщност лекарствата модулират и променят патологично функциониращия CFTR на клетъчно ниво, поради което не са генна терапия *per se*. Разделят се в две основни групи – модулиращи CFTR-протеина и не-CFTR модулатори (64, 233, 246). В първата група се включват: потенциатори, увеличаващи времето през което CFTR-канала е отворен, което води до по-голямо движение на йоните; коректори – облекчаващи узряването на CFTR-протеина, което води до подобрения му транспорт до клетъчната мембрана; амплификатори,

селективно повишаващи количеството незрял CFTR-протеин, осигурявайки допълнителни субстрати за действие на коректорите, потенциаторите и другите модулатори; прочитащи през преждевременния стоп-кодон (ПСК), които селективно се закрепят към рибозомите и „потискат“ ПСК, като го „прескачат“ и на негово място се вкарва друга неутрална аминокиселина, а остатъчното транслиране на белтъка продължава; стабилизатори, подобряващи стабилността на CFTR-протеина (или на „спасения“ от коректори/амплификатори протеин) на клетъчната мембрана; молекули, които възстановяват иРНК – те свързват се с дефектната иРНК като я коригират и по този начин се транслира „нормален протеин“; антисенс-олигонуклеотиди – малки нуклеотидни последователности, поправящи сплайсинг дефект, по все още неизяснен механизъм. Не-CFTR модулатори или т. нар. „заобикалящи“ терапии, акцентират чрез активиране на други хлорни транспортери чрез P2Y2 или потискане на натриевия канал (ENaC инхибитори), като по този начин се постига баланс между йоните (49, 63).

Първият медикамент е одобрен през 2012 година за пациенти с МВ, носители на мутации от клас III („гейтинг мутации“). Молекулата е разработена за носители на F508del, най-често срещаната мутация, и се оказва изключително добър потенциатор с подобрение от 10-15% във форсирания експираторен обем (FEV1) и нормализиране на стойностите от потните тестове (<60 mmol/l) в първите седмици на приложението му (199). От 2017 година Агенцията за контрол на храните и лекарствата в САЩ (FDA) разширява показанията с нови мутации от клас IV и V. Към момента ivacaftor е показан за терапия над 4 месечна възраст, с поне една мутация G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N, S549R или R117H (клас III) + 2789+5G- > A, 3849+10kbC->T, 3272-26A->G, 711+3A->G, E56K, P67L, R74W, D110E, D110H,

R117C, L206W, R347H, R352Q, A455E, D579G, E831X, S945L, S977F, F1052V, R1070W, F1074L, D1152H и D1270N (клас IV и V). Като сериозен страничен ефект се определя потенциалната възможност за развитие на катаракта (104, 200).

Разработен е и комбиниран медикамент – ivacaftor и коректор, показан за пациенти над 2 годишна възраст хомозиготи за F508del – мутация от клас II. Около 60% от пациентите с МВ са в този клас, а хомозиготите по F508del са около 34%. Комбинацията с коректора lumacaftor е изследвана в няколко големи проучвания и също е доказано, макар и в по-малка степен, подобрение и задържане в стойности по-големи от изходните на FEV1 и понижаване на стойностите от потните тестове (63, 146). Резултатите не достигат получените при ivacaftor, но лекарството получава разрешение през 2015 година, поради доказано намаление на екзацербациите и подобряване показателите за ИТМ (153). Част от пациентите все пак не се повлияват значимо от терапията. При напреднало чернодробно увреждане е нужна редукция на дозата (94, 272).

Друг комбиниран медикамент е ivacaftor/tezakaftor, който е на пазара от 2018 година, е показан, както за хомозиготи по delF508, така и за хомозиготи по delF508 и за хетерозиготи над 12 години с delF508 и друга мутация от следните: P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711+3A→G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789+5G→A, 3272-26A→Gи 3849+10kbC→T. Резултатите отново не са задоволителни (110, 245). Към момента медикаментът не се реимбурсира в България, пациенти с горепосочените мутации имат достъп до друга терапия.

Най-новият продукт одобрен в САЩ в края на 2019 и получил одобрение за Европа от август 2020 година тройната комбинация от ivacafor/tezacaftor/elexacaftor. Понастоящем е показан за пациенти над 6 години, носители на поне една мутация delF508. Първоначално публикуваните резултати от клинични проучвания определят

медикамента като „лекарството чудо“ за над 90% от всички пациенти с МВ (48, 195, 203). Налице е бързо и устойчиво повишение на теглото и FEV1.

В България понастоящем успешно се лекуват и проследяват пациенти и с трите медикамента, според индикациите и генетичния профил: ivacaftor – над 4 месечна възраст, lumacaftor/ivacaftor – над 2 годишна възраст, и ivacafor/tezacaftor/elexacaftor – над 6 годишна възраст (21, 23, 27).

Всички тези медикаменти се метаболизират в черния дроб, което е причина за стриктно проследяване на чернодробните показатели при лекуваните пациенти (260, 272). По отношение на хепатотоксичността до момента липсват данни за остра чернодробна недостатъчност, хроничен хепатит или токсична увреда по типа на *vanishing bile duct syndrome*, протичащ с хронична тежка холестаза и загуба на интрахепатални жлъчни пътища, свързани с тройната терапия (189). В големите рандомизирани проучвания до 25% от пациентите повишават трансаминазите преходно и безсимптомно, около 3 пъти над горна граница на нормата, с последващо спонтанно нормализиране. Подобни ефекти са налице и в плацебо групата. Съобщават се случаи на остър холецистит, вероятно поради повишена жлъчна секреция, възможно е и влияние на модифициращи фактори. Механизмите не са ясни, проучва се връзката с цитохром p450 индуктор, водеща до потенциално токсични или имуногенни ефекти върху метаболизма. Възможни са и междулекарствени взаимодействия (189).

Известно е, че CFTR модулаторната терапия с lumacaftor/ivacaftor и ivacafor/tezacaftor/elexacaftor намалява стойността на потния тест, подобрява белодробната функция и храненето при пациентите с МВ в различна степен. Все още остава неясен ефектът на CFTRm върху прогресията на чернодробната фиброза и CFLD. Ретроспективно проучване на Levitte S et al. (2023)

анализира данни от лечението на деца и юноши с lumacaftor/ivacaftor и/или elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, като се фокусира върху нарушенията в чернодробните тестове и индексите на фиброза от проведена еластография. Установява се, че при пациентите с CFLD на лечение с lumacaftor/ivacaftor има значително намаляване на ГГТ, на съотношението АСАТ/тромбоцити, както и на съотношението ГГТ/тромбоцити, за разлика от тези на лечение с elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, както и тези без CFLD (186). Това са първите доказателства, че lumacaftor/ivacaftor може да подобри чернодробната фиброза при пациенти с МВ и CFLD.

Ramsey ML et al. (2022) проучват ефекта на CFTRm върху развитието на цироза при пациенти с МВ. Те провеждат ретроспективен анализ за период от 5 години върху всички пациенти с МВ (7201 пациента), като изключват тези, претърпели чернодробна трансплантация, както и тези с друга етиология на чернодробно заболяване (вирусен хепатит, алкохолно увреждане и други). Пациентите са групирани спрямо приема на CFTRm (12.6%), урсодеоксихолева киселина (7.0%), и двата медикамента (1.4%) или без лечение (74.3%). Анализът показва, че нито един пациент на лечение с CFTRm не е развил цироза на черния дроб (238).

С нарастване употребата на CFTRm при пациенти с МВ, включително и при пациенти с напреднало чернодробно увреждане, както и при пациенти след чернодробна трансплантация, са налице данни за безопасността на медикамента и при тези случаи (102). Ragan H et al. (2022) съобщават за 10 пациента на средна възраст 22.1 години (14-43.3), с проведена чернодробна трансплантация преди средно 6.9 години (0.6-22). Повечето пациенти (80%) са получили намалена или пълна доза на elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor за среден период от 10.4 месеца (7-12 месеца). Флуктуация в чернодробните ензими се наблюдава при всички пациенти, но лечението е спряно само при двама от тях. Налице е подобрение на ИТМ и на

белодробната функция. Може да се заключи, че лечението с CFTRm след чернодробна трансплантация е безопасно и с клинична полза за пациентите (235).

Независимо от успехите в лечението на МВ в глобален мащаб, модулаторната терапия остава недостъпна за някои региони по света. Освен това, не всички пациенти са показани за лечение с познатите вече CFTRm, включително пациенти с CFLD (93). Продължават проучванията върху алтернативни подходи, включително патогенетични, генна терапия и профилактика (34, 35, 36, 76, 77).

# 3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

## 3.1. ЦЕЛ

Основната цел на настоящия труд е да се дефинират клиничните и лабораторни характеристики, диагностичния и терапевтичен подход, протичането и прогностичните маркери при пациенти с МВ и чернодробно увреждане.

## 3.2. ЗАДАЧИ

1. Да се анализират антропометрични, клинични, лабораторни и молекулярно-генетични показатели при пациентите с МВ. Да се характеризира клиничната изява, довела до диагностициране на заболяването.
2. Да се анализира средната възраст и клинична изява при поставяне на диагнозата в условията на липсващ масов неонатален скрининг за МВ.
3. Да се опишат честотата и характеристиките на чернодробното увреждане при пациентите с МВ.
4. Да се оцени корелацията между състоянието на черния дроб при пациентите с МВ и тяхната клинична изява, лабораторни показатели, ехографска находка и терапия.
5. Да се потърсят зависимости между чернодробното увреждане при МВ и тежестта на белодробно засягане, прогресията на заболяването и възникване на усложнения.
6. Да се потърсят зависимости при пациенти с МИ и МВ. Да се проучи ролята на МИ за изявата и тежестта на чернодробното увреждане.
7. Да се проследи чернодробния статус и показатели на пациенти на лечение с CFTR-модулатори.

8. Да се предложи диагностично-терапевтичен алгоритъм за навременна оценка на състоянието на черния дроб и адекватно лечение при пациентите с МВ.

# 4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

## 4.1. ПАЦИЕНТИ

В дисертационния труд са включени две проучвания:

### 4.1.1. Ретроспективно проучване

Включени са 167 пациента с диагностицирана МВ, които се проследяват и лекуват в Експертен център за пациенти с муковисцидоза към УМБАЛ „Александровска“ ЕАД. Обхванат е период от 7 години – от януари 2015 до декември 2021 година.

### 4.1.2. Проспективно проучване

Включени са 82 пациента с диагностицирана МВ, които се проследяват и лекуват в Експертен център за пациенти с муковисцидоза към УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, и са на терапия с CFTR модулатори (CFTRm) от поне една година. Обхванат е период от 3 години и 6 месеца – от януари 2020 до юни 2023 година.

## 4.2. МЕТОДИ

Във връзка с ретроспективното проучване е проведен анализ на медицинската документация на пациентите с МВ към Експертен център по муковисцидоза при УМБАЛ „Александровска“ ЕАД за периода от януари 2015 до декември 2021 година. Това са 167 пациента на възраст от 0 до 64 години.

1. За пациентите е събрана подробна анамнеза и е описан физикалния статус при поставяне на диагнозата, както и при проследяване:

- фамилна обремененост
- данни за бременността и раждането

- данни за неонаталния период
- клинична изява с начало на симптомите и ход на заболяването – първи симптоми, диагностициране на пациента с потен тест и/или генетично-молекулярен анализ, засегнати органи и системи при поставяне на диагнозата
- минали заболявания
- придружаващи заболявания
- антропометрични данни
- физикален статус по органи и системи

2. Систематизирани са данните от проведените на пациентите изследвания:

- лабораторни данни – хематологични, биохимични, имунологични показатели
- резултати от потен тест
- генетичен анализ
- микробиологични резултати
- функционално изследване на дишането (ФИД)
- образни изследвания

3. За пациентите са систематизирани данните за провежданото лечение, както и профилактика и лечение на усложненията

- ензимзаместителна терапия с панкреасни ензими
- антибиотици
- инхалаторна терапия
- физиотерапия
- лечение с урсодеоксихолева киселина

4. За пациентите са събрани и данните за настъпили усложнения, продължителност на живота и причина за смъртта

- пневмоторакс
- хемоптиза

- тежка дихателна недостатъчност
- алергична бронхопулмонална аспергилоза (АБПА)
- чернодробно увреждане (CFLD)
- диабет

Във връзка с проспективното проучване е проведен анализ на 82 пациента с диагностицирана МВ, които се проследяват и лекуват в Експертен център за пациенти с муковисцидоза към УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, и са на терапия с CFTR модулатори. Обхванат е период от 3 години и 6 месеца – от януари 2020 до юни 2023 година. За пациентите е събрана подробна анамнеза и е описан физикалния статус при поставяне на диагнозата и при започване на лечението, систематизирани са данните от проведените на пациентите изследвания, провежданото лечение и развитието на заболяването.

**Описание на методите**

**Потният тест** е проведен при всички пациенти за доказване на заболяването, а впоследствие и за проследяване на ефект от лечение с CFTRm. След старателно измиване на гърба на пациента с дестилирана вода, с пинсета се полага филтърна хартийка, предварително измерена в стъкленица на лабораторна везна с точност до 4 цифра след десетичната запетая. Филтърната хартийка се закрепя с помощта на найлон, левкопласт и бинт на гърба на пациента, където престоява 12 часа. След определения период, филтърната хартийка се взема и се измерва отново, заедно с конкретната стъкленица. При разлика по-малко от 100 мг се счита, че потният тест е неуспешен и трябва да се повтори. При разлика над 100 мг, полученото число се записва като (А) и се пристъпва към обработка и изследване на материала. В стъкленицата се накапват 5 мл дестилирана вода, в която се накисва добре филтърната хартийка и престоява поне 24 часа. На следващия ден след добро изстискване

на хартийката в разтвора (без да се пипа с ръце) се вземат 2,5 мл и се поставят в специална стъкленица, където се накапват 3 капки 0,7Н азотна киселина, 3 капки дифенилкарбазон (индикатор) и полученият разтвор се титрира с живачен оксид. При получаване на лилава оцветка количеството живачен оксид необходим за титруването се отбелязва като Б и заедно с А се използва следната формула:

Потен тест (Cl mmol/l) = (Б/Бст)x2x100,11/А,

където Бст е изразходваното количество живачен оксид за титриране на стандартен разтвор в същия ден, когато се титрира пробата. Обикновено Бст в зависимост от околната температура и доколко е пресен индикаторът варира между 0,8 и 1,2.

Концентрации на измерения хлор над 60 mmol/L са диагностични, концентрации 30–59 mmol/L са междинни и налагат повторение, а концентрации под 30 mmol/L са приемат за нормални – отрицателен потен тест. При резултат над 180 ммол/л се търсят технически грешки, възможно е и замърсяване в различните етапи от провеждане на теста. При всеки пациент тестът се повтаря толкова пъти, колкото е необходимо, като поне два положителни теста са нужни за поставяне на диагнозата на базата на потен тест.

**Генетичният анализ** на пациентите включва анализ на *CFTR* гена, включително анализ на вътрегенните преаранжировки и интронни последователности, а за някои пациенти молекулярният анализ е допълнен и с паралелно секвениране. Първоначално повечето пациенти са изследвани със секвениране по Сангер на определени *CFTR* екзони. Описани са съобразно GenBank NM_00492.3 (*CFTR*). Допълнително някои пациенти с неизвестна втора мутация са изследвани с анализ за масивно паралелно секвениране на целия кодиращ *CFTR* гена регион, прилежащите splice site връзки и някои интрони. Този анализ е проведен чрез MiSeq System™ (Illumina, USA). При необходимост някои позитивни случаи са потвърдени допълнително с таргетен анализ по Сангер.

При някои от пациентите е приложен и multiplex ligation-dependent probe amplificiation (MLPA) анализ. Патогенността на мутациите е анализирана според базата данни CFTR2 database (www.cftr2.org).

**Микробиологичният анализ** е проведен върху материал от храчка, поставена в инкубатор на температура 37 °C за 24–48 часа. За изолация и детекция на етиологичния причинител е използван стандартен протокол за микробиологично изследване като посява на кръвен агар, обогатен с 5% овча кръв, MacConkey агар, Candida chrome агар и шоколадов агар с добавен ванкомицин за бактерии от групата Moraxellae и Haemophilae. Култивирането на пробите се осъществява в аеробна среда, както и в микроаерофилна атмосфера за различните патогени. За идентификация на изолираните щамове са използвани продукти и системи Crystal BD BBL (BBL; Becton, Dickinson, Germany) и RapID System Remel Thermo Fisher Scientific (Remel, Thermo Fisher Scientific Remel Products; Santa Fe, USA). Антибиограма за чувствителност е изработена по дисково-дифузионния метод Kirby-Bauer.

**Функционално изследване на дишането (ФИД)** с извършване на бронходилататорен тест за оценка на отговора (БДО) при постъпване в клиниката, в съответствие със световните стандарти (ATS/ERS). Пост-бронходилататорната спирометрия се провежда съгласно утвърдения в Клиниката по педиатрия на УМБАЛ „Александровска“ протокол, съобразен с възрастта на изследваните пациенти: 15 мин след прилагането на 200 μg (две впръсквания дозиран аерозол с обемна камера) Salbutamol или 0.2 ml/kg, приложени с компресорен небулизатор с маска. БДО се оценява като процент от промяната на FEV1 в сравнение с изходната измерена стойност и като абсолютна промяна в ml. БДО се отчита като положителен при ΔFEV1≥12% и/или 200 ml. Спирометриите са проведени в Кабинета за изследване на дихателните функции на Клиника по Педиатрия, УМБАЛ “Александровска” с

MASTERSCREEN PNEUMO SPIROMETER’98 (Care Fusion) при спазване на разписаните технически инструкции за работа, почистване и дезинфекция на апаратурата и на кабинета:

1. Включване на апарата, загряване – 20 мин.
2. Смяна на ситото на MASTERSCREEN PNEUMO.
3. Настройката на пневмотахографския преобразувател се извършва с еднолитрова помпа, след предварително вкарване в паметта на апарата данните за околната температура, относителна влажност (%), барометрично налягане (кРа). Максимално допустимите отклонения за коригиращия фактор са между 0.9-1.1, а за стандартното отклонение – до 3%. Периодично (минимум веднъж седмично) се прилага и биологичен вътрелабораторен контрол от здрав член на колектива.
4. При спиране на електрическия ток, апаратът се изключва от мрежата, за да се предпази от токов удар при неговото идване.

Спирометърът MASTERSCREEN PNEUMO е устройство, измерващо дебит въздух, посредством пневмотахограф, тип Lilly. Изследването се извършва в следната последователност:

a. бавна спирометрия;
b. форсирана експирация;

Противопоказания за провеждане на спирометрия са много тежък астматичен пристъп (животозастрашаващ), пневмоторакс, хемоптиза, скорошна гръдна/коремна оперативна интервенция, фебрилитет, скорошна очна хирургична интервенция, тежка глаукома, изоставане в нервно-психическото развитие, злоупотреба с алкохолни и психоактивни средства, активна туберкулоза.

**Ехографията на коремни органи** е метод на образна диагностика, използващ ултразвукови вълни, които се отразяват на границата между различни по плътност структури и водят до оценка на образи в реално време. Тя е значим диагностичен метод за определяне на

анатомични особености, размери и патологични изменения. Изследването е неинвазивно и безболезнено, относително бързо и достъпно, не се използва йонизираща радиация, което го прави безопасно за всички възрасти. Доплеровото изследване на кръвотока дава възможност за оценка на чернодробните съдове и индивидуалните характеристики в норма и патология. Индикациите включват скрининг и проследяване при пациенти с чернодробно увреждане при муковисцидоза, наличие на огнищни процеси, нарушения на кръвотока, спленомегалия, портална хипертония и заболявания на жлъчния мехур.

## 4.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен с програма Software package for statistical analysis (SPSS®), IBM 2021, версия 26 (2021) и Excel (v.2013). Графичните изображения, са изготвени основно с помощта на Excel и на SPSS v.26. Анализът на данните включва:

- Дескриптивна статистика. Използвани са методите на дескриптивната статистика за описание на демографската и клинична характеристика на пациентите, както и за изследваните лабораторни и функционални параметри. За представяне на категорийни данни са използвани абсолютен брой и относителен дял, докато качествените са представени чрез показателите на централната тенденция и разсейването.
- Тестове за определяне нормалността на разпределението (Колмогоров-Смирнов, Шапиро-Уилкс). Тестовете са използвани за проверка дали данните за количествените променливи са с нормално разпределение, като е прилаган единият или другият тест, в зависимост от обема на извадките. Формата на разпределението определя преценката дали ще

бъдат използвани параметрични или непараметрични тестове за сравнение на извадки, както и кои характеристики на централната тенденция и разсейването ще бъдат използвани за описателно представяне на изходните данни.

- Тестове за сравняване на количествени показатели в различните групи (сравняване на средни – means). При сравняването на две групи използвахме T-test при нормално разпределение и Mann-Whitney при разпределение, различно от нормалното. При сравняване на повече от две групи – ANOVA – post-hoc-analysis или съответно Kruskal-Wallis test.
- Корелационен анализ. Използвахме корелационен анализ – между категорийни признаци (метод на $\chi$ - квадрат при повече от две групи на една от променливите и Fisher's Exact test при таблици с размерност 2*2); между категорийни и количествени признаци (Дисперсионен анализ – ANOVA) и между количествени признаци (корелационен и регресионен анализ) за определяне наличието на връзка (с асоциативен или причинно-следствен характер) между два или повече показателя, каква е нейната сила, форма и посока. За ниво на значимост бе избрано $\alpha=0.05$, т.е. при стойности на $p<\alpha$ се отхвърля нулевата хипотеза.

# 5. РЕЗУЛТАТИ

## 5.1. РЕТРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ

В ретроспективното проучване са включени 167 пациента с диагностицирана МВ, които се проследяват и лекуват в Експертен център за пациенти с муковисцидоза към УМБАЛ „Александровска“ ЕАД. Обхванат е период от 7 години – от януари 2015 до декември 2021 година, през който 10 пациента са починали, 13 са напуснали страната и отпадат от проследяване, 1 пациент е изгубен от проследяване. Новодиагностицираните пациенти са с относително постоянен брой. Дизайнът на проучването показва динамиката на наблюдаваната кохорта и относителната ѝ стабилност (Фигура 13). В табличен вид са представени данните от анализа за цялото ретроспективно проучване по възраст, пол и отпадналите при проследяване пациенти (Таблица 5).




Фигура 13. Дизайн на ретроспективното проучване.

| | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | Общо |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Под 18 год. | 56 | 60 | 70 | 77 | 76 | 77 | 83 | 93 |
| Над 18 год. | 44 | 51 | 52 | 59 | 57 | 58 | 60 | 74 |
| | | | | | | | | |
| Момчета | 58 | 64 | 70 | 76 | 75 | 77 | 83 | 95 |
| Момичета | 42 | 46 | 52 | 60 | 58 | 58 | 60 | 72 |
| | | | | | | | | |
| Общ брой | 100 | 110 | 122 | 136 | 133 | 135 | 143 | |
| Починали | 0 | 1 | 1 | 6 | 1 | 0 | 3 | |
| Напуснали България | 2 | 1 | 4 | 2 | 3 | 1 | 0 | |
| Изгубени от проследяване | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| Нови | | 12 | 12 | 17 | 6 | 7 | 9 | |

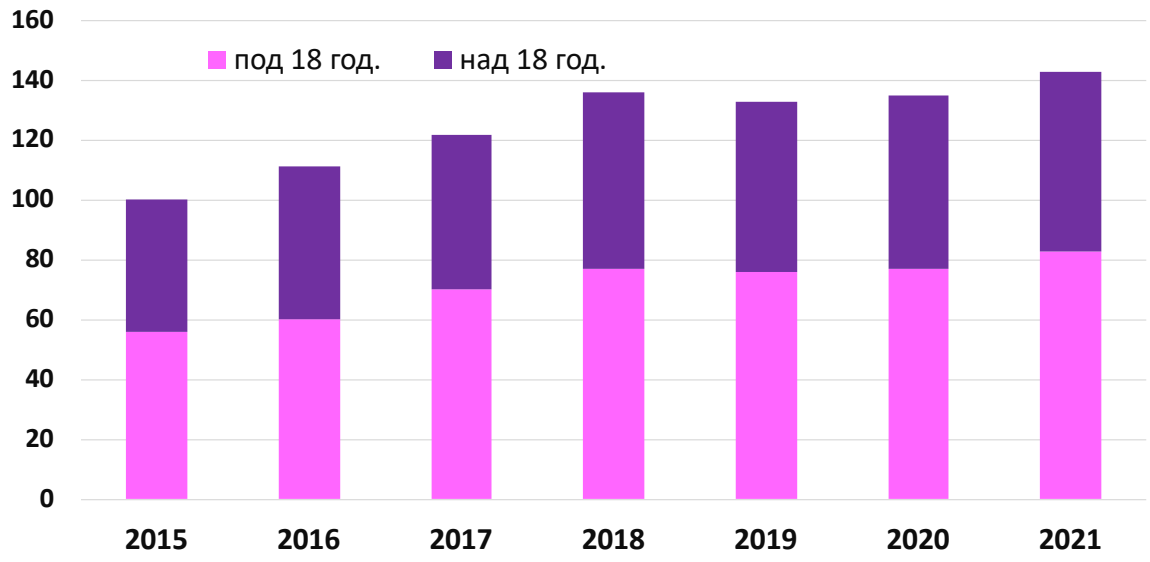
Таблица 5. Пациенти по брой, възраст, пол и отпаднали от проучването.

Възрастта на пациентите в проучването е основен показател, като се има предвид, че МВ е заболяване с традиционно лимитирана продължителност на живота. В България пациентите над 18 години са възрастни. Прави впечатление, че съотношението деца/възрастни варира между 56% и 58% в полза на децата, без статистически значима разлика през годините $p>0,5$ (Фигура 14).

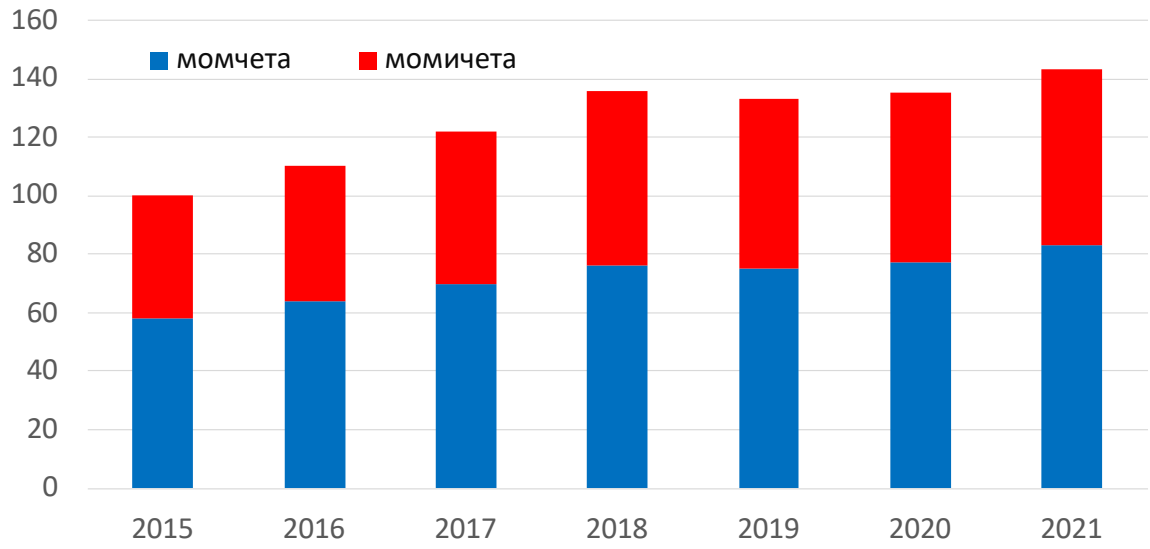
Съотношението на пациентите по пол варира между 42% и 44% момичета, без статистически значима разлика през годините $p>0,5$ (Фигура 15).

Обобщено данните са представени на Фигура 16.

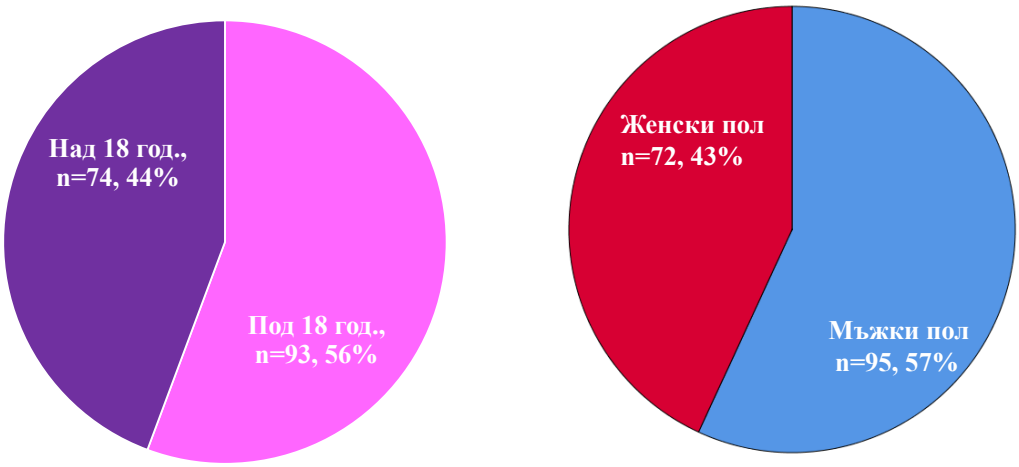
Показателите възраст и пол ще бъдат включени в повечето анализи на този дисертационен труд, за да се покажат някои интересни зависимости сред пациентите.




Фигура 14. Съотношение деца/възрастни през годините.

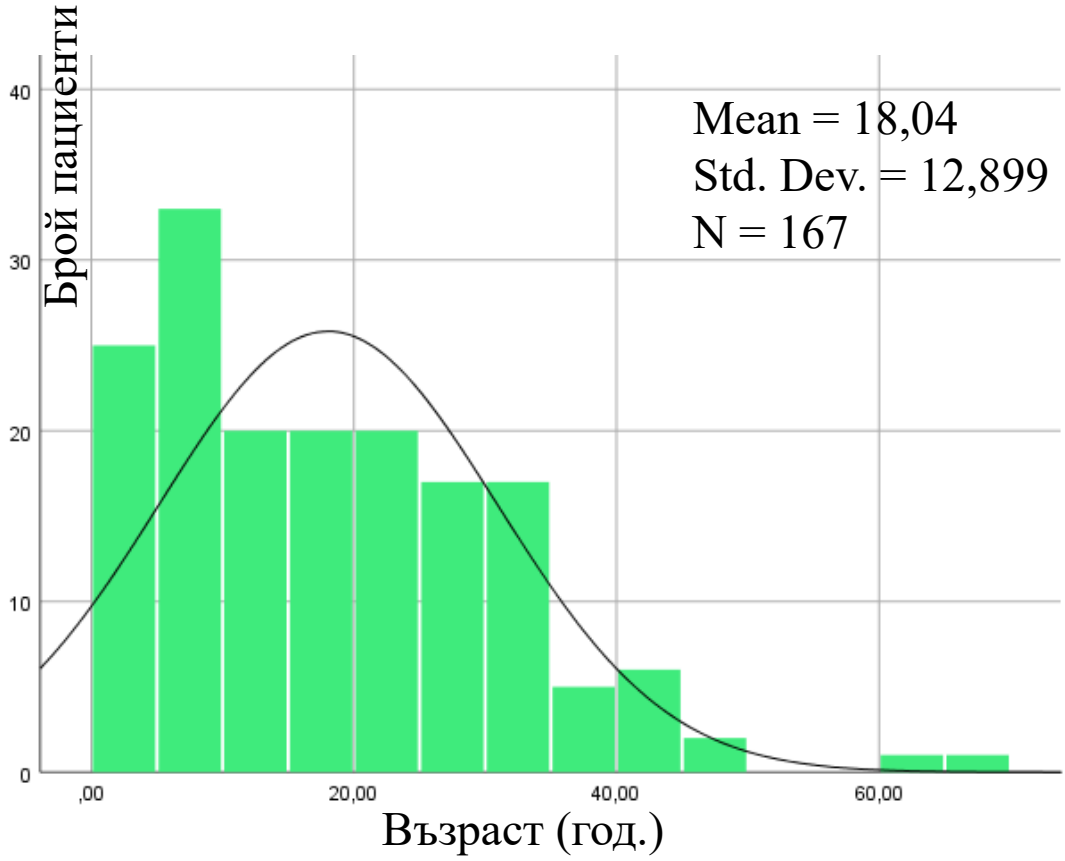



Фигура 15. Съотношение момчета/момичета през годините.

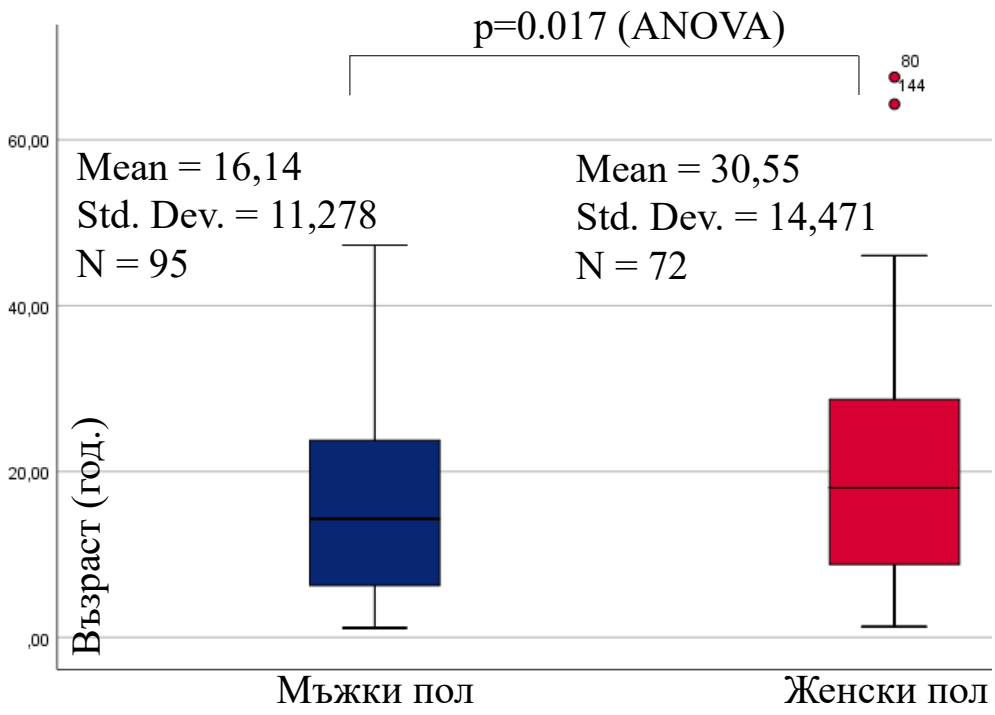



Фигура 16. Разпределение на пациентите в проучването по възраст и пол.

Средната възраст на пациентите в проучването към момента на анализа е 18,04 години – от 1,13 до 67,5 години. Пациентите от женски пол са с около 4 години по-голяма средна възраст, което е сигнификантно (ANOVA p= 0,017). Медианата също е в полза на момичета с над 3 години разлика. Тези данни са по-ниски от средните за Европа, където средната възраст на пациентите в регистрите за МВ е около 25 години (Фигури 17 и 18).

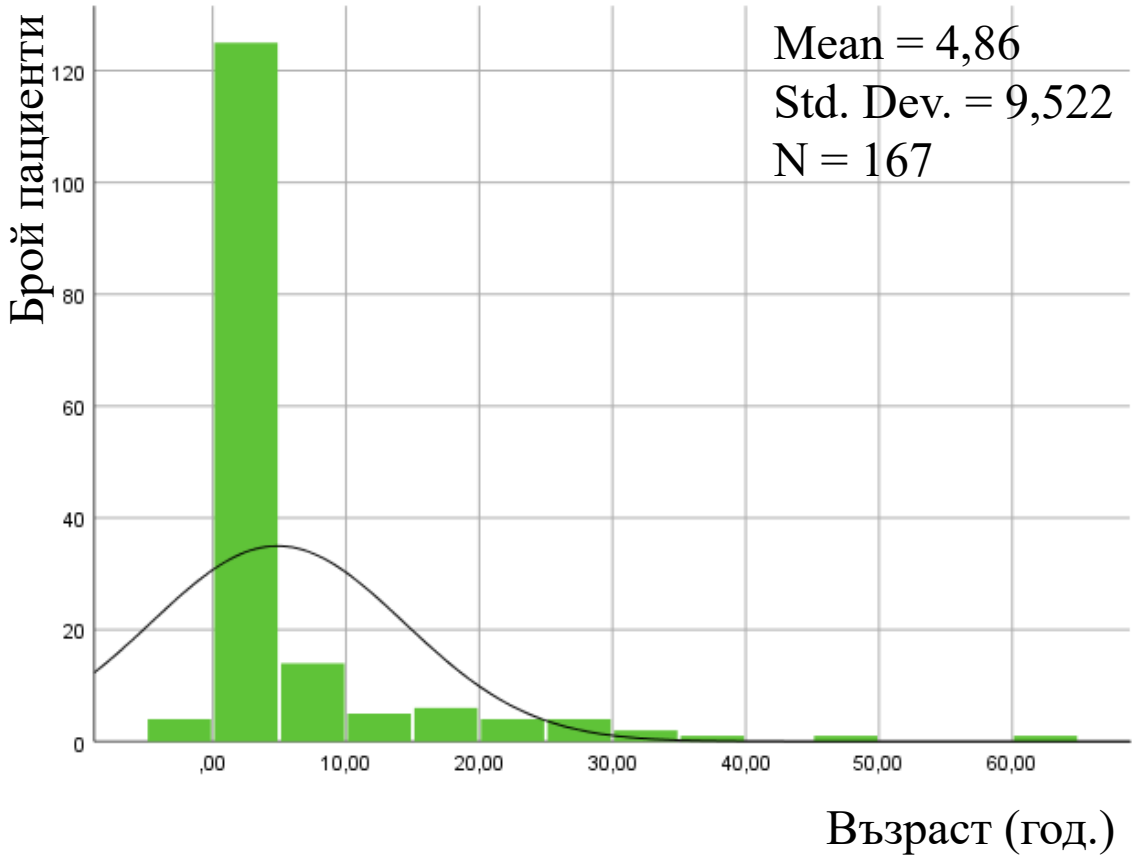



Фигура 17. Брой на пациентите по възраст.

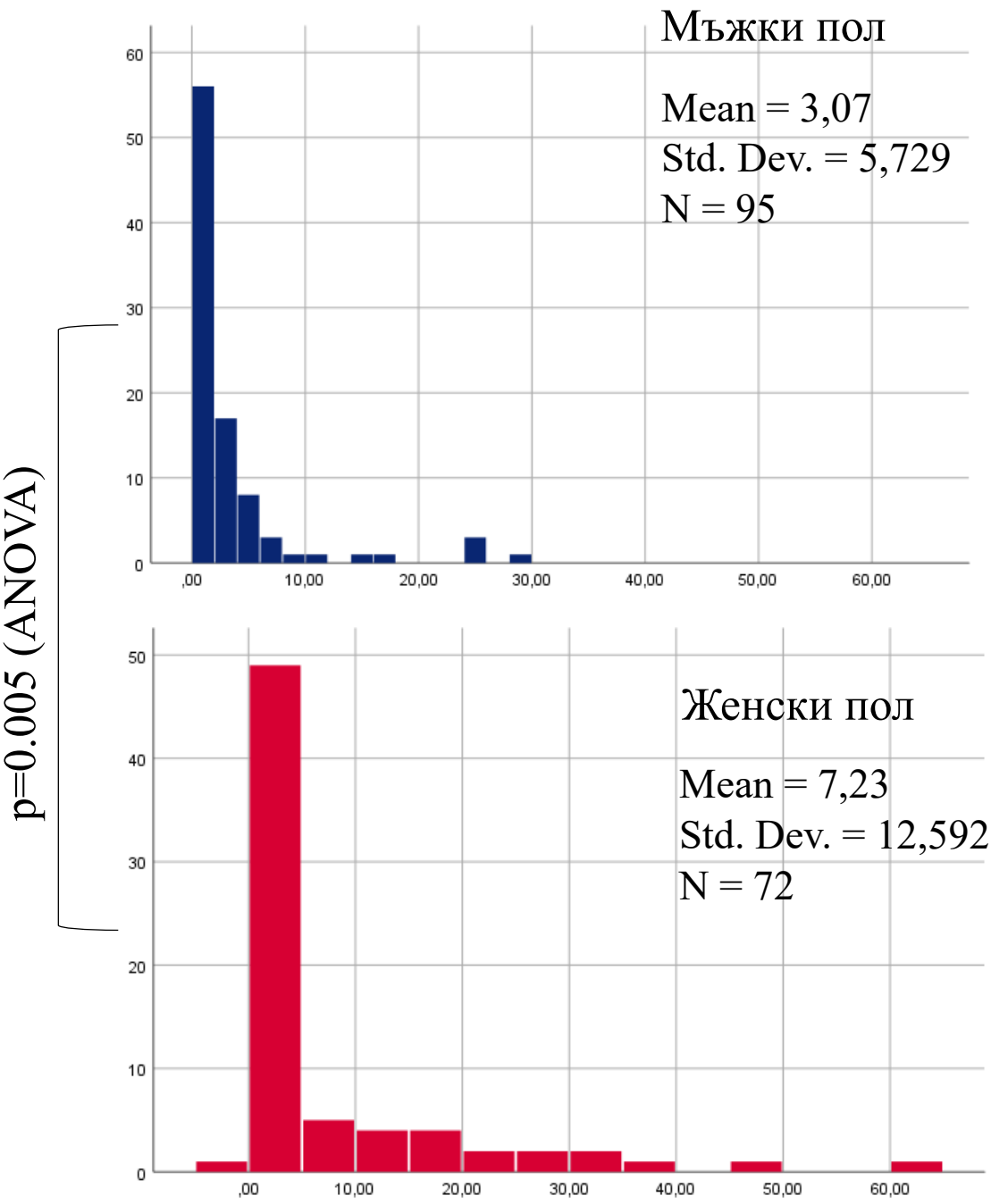



Фигура 18. Брой на пациентите по възраст и пол.

На фигури 19 и 20 е представена средната възраст на диагноза, която е 4,86 години (0-64,3), както и разпределението по пол. Момчетата се диагностицират по-рано с около 4 години, като разликата е статистически значима. Независимо от това, възрастта, при която пациентите се диагностицират, е по-висока от средната за Европа, като водеща причина е липсата на национален неонатален скрининг за МВ. Това забавя навременното започване на лечение и е рисков фактор за възникване на усложнения и по-лоша прогноза.



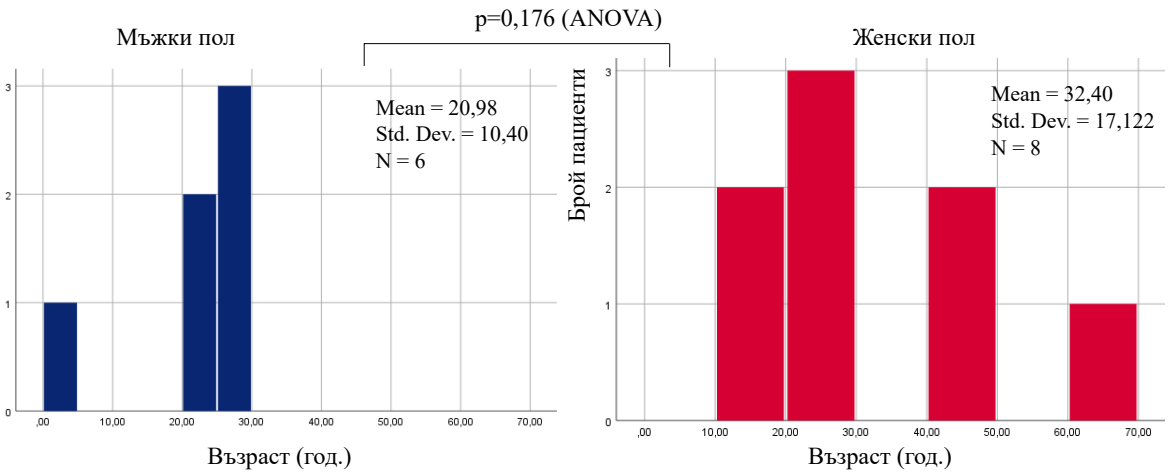

Фигура 19. Възраст при поставяне на диагнозата на пациентите.




Фигура 20. Възраст в зависимост от пола при поставяне на диагнозата на пациентите.

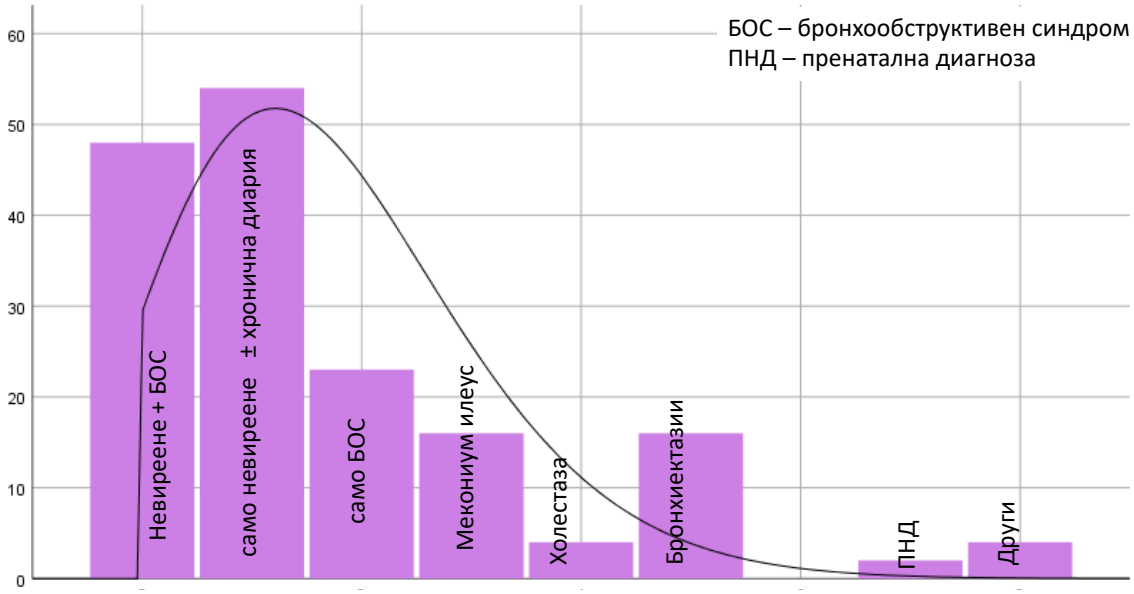
Средната възраст на смърт при болните от МВ е 27,51 години (0,58-63,5). Разпределена по пол, тя е значително по-ниска при пациентите от мъжки пол. Въпреки, че данните от анализа показват липса на статистически значима разлика (ANOVA p=0,176), трябва да се има предвид малкия брой на починалите пациенти спрямо цялата група анализирани (Фигура 21). Това са 6 момчета и 8 момичета. При едно от

децата причина за смъртта не е основното заболяване. Средната възраст на смърт при пациенти с МВ за Канада за 2021 година е 34 години, т.е. все пак можем да направим извода, че женският пол е свързан с повишена устойчивост (97). Причините не са установени. Въпреки това, в общ план относно възрастта на смърт изоставаме чувствително в сравнение с големите страни.




Фигура 21. Средна възраст на смърт в зависимост от пола.

На фигура 22 са представени най-честите клинични изяви, които стават повод за диагностициране на заболяването, а именно лошото наддаване на тегло (невиреене) и наличието на хронична диария. На второ място са пациентите с бронхообструктивен синдром (БОС) и невиреене, а тези с изява на предимно белодробни симптоми са на трето място. Мекониум илеусът и бронхиектазиите са други причини за поставяне на диагнозата МВ. С най-малък процент все още са пациентите, получили своята диагноза чрез пренатално изследване. По-рядко в стълб „други“ попадат един пациент с хроничен панкреатит, един пациент с болна от МВ сестра, диагностициран насочено и рано, и един пациент с бъбречна недостатъчност (Фигура 22 и Таблица 6).



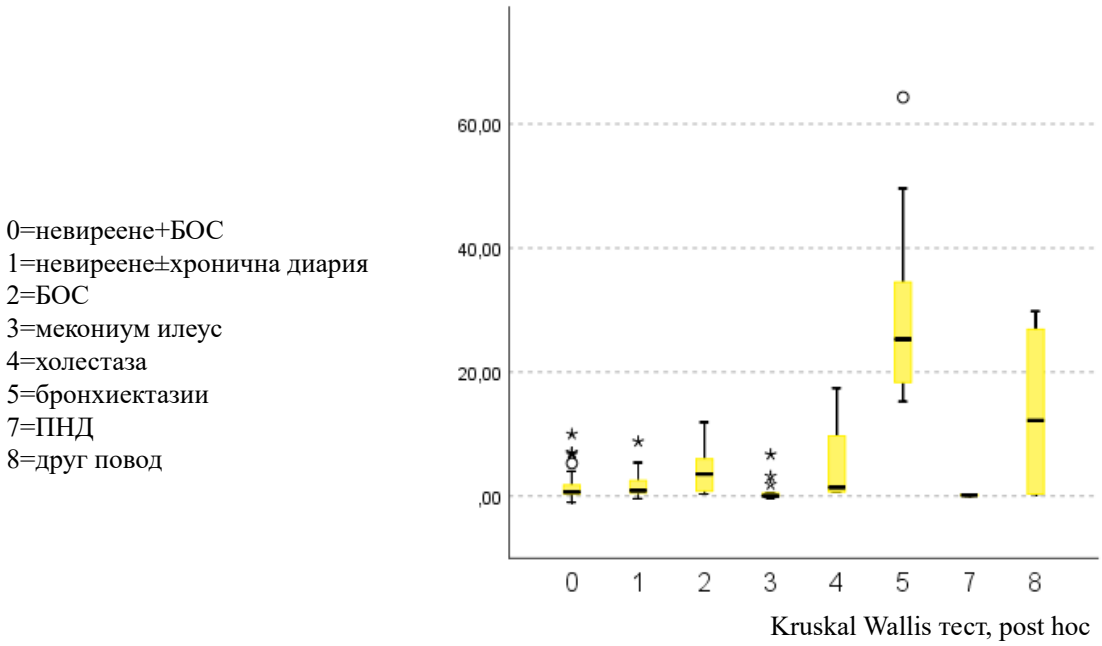

Фигура 22. Честота на клиничната изява по повод за диагностициране.

| | Общ брой | Момчета | Момичета | p (chi-square) |
|---|---|---|---|---|
| Невиреене + БОС | 48 | 29 | 19 | 0.077 |
| Невиреене ± хронична диария | 54 | 35 | 19 | |
| БОС | 23 | 11 | 12 | |
| Мекониум илеус | 16 | 11 | 5 | |
| Холестаза | 4 | 2 | 2 | |
| Бронхиектазии | 16 | 4 | 12 | |
| Пренатално диагностицирани | 2 | 1 | 1 | |
| Други | 4 | 2 | 2 | |
| | | | | |
| Всички с БОС | 71 (42,5%) | 40 | 31 | 0.490973 |
| Всички с невиреене | 102 (61,1%) | 64 | 38 | |

Таблица 6. Повод за диагностициране – общ брой и разпределение по пол.

От таблицата е видно, че повече момчета се диагностицират с мекониум илеус, а повече момичета – с бронхиектазии, но разликите не достигат статистическа значимост ($p>0.05$, Chi-square). Тези разлики може и да са свързани с различната възраст на диагностициране, а голяма част от пациентите с бронхиектазии се диагностицират и като възрастни.

Фигура 23 показва възрастта на поставяне на диагноза спрямо повода за диагностициране. Резултатите от анализа показват сигнификантни различия (p=0,000). Очаквано, пациентите с пренатално поставена диагноза са най-малки по възраст, следвани плътно от тези с МИ.



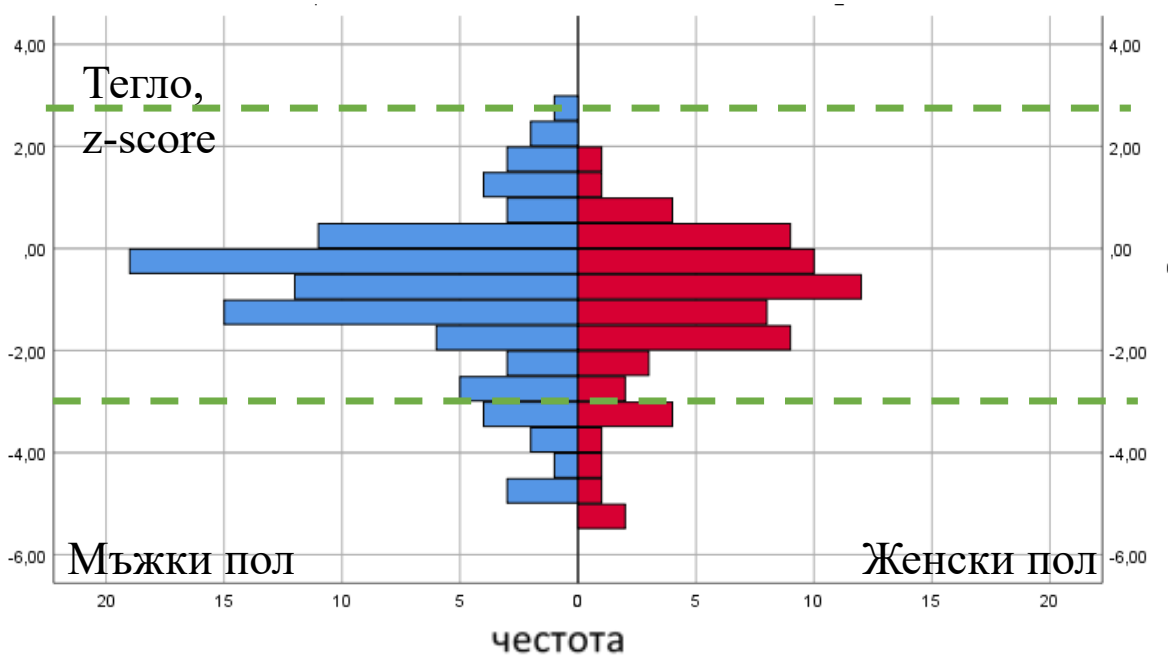

Фигура 23. Възраст на поставяне на диагнозата спрямо повода за диагностициране.

Статистически значима разлика е налична в групата на МИ спрямо всички други групи, освен пациентите с пренатална диагноза (ПНД). Сигнификантна е разликата и между пациентите само с гастроинтестинални симптоми и тези само с белодробни симптоми (групи 1 и 2). Когато изявата на заболяването е само БОС, диагнозата закъснява спрямо пациентите с хронична диария или спрямо тези с хронична диария и БОС (Таблица 7).

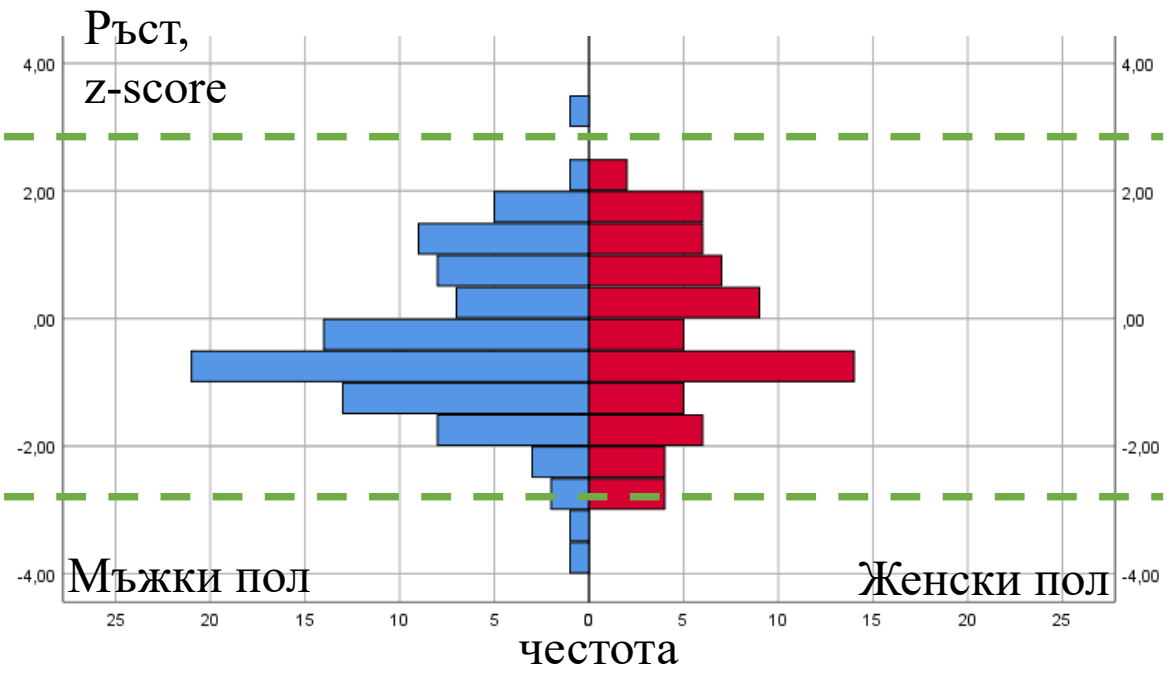
| Повод за диагностициране – различни групи | p (междугрупово сравнение) |
|---|---|
| ПНД vs. БОС | 0,016 |
| ПНД vs. бронхектазии | 0,000 |
| Мекониум илеус vs. невиреене + БОС | 0,010 |
| Мекониум илеус vs. невиреене ± хронична диария | 0,001 |
| Мекониум илеус vs. други | 0,017 |
| Мекониум илеус vs. холестаза | 0,016 |
| Мекониум илеус vs. БОС | 0,000 |
| Мекониум илеус vs. бронхектазии | 0,000 |
| невиреене + БОС vs. БОС | 0,004 |
| невиреене + БОС vs.бронхектазии | 0,000 |
| невиреене ± хронична диария vs. БОС | 0,035 |
| невиреене ± хронична диария vs.бронхектазии | 0,000 |
| други vs. бронхиектазии | 0,028 |
| холестаза vs. бронхиектазии | 0,030 |
| БОС vs. бронхиектазии | 0,001 |

Таблица 7. Статистически значими различия във възрастта на диагнозата по групи симптоми за поставяне на диагнозата. (vs – versus, сравнение).

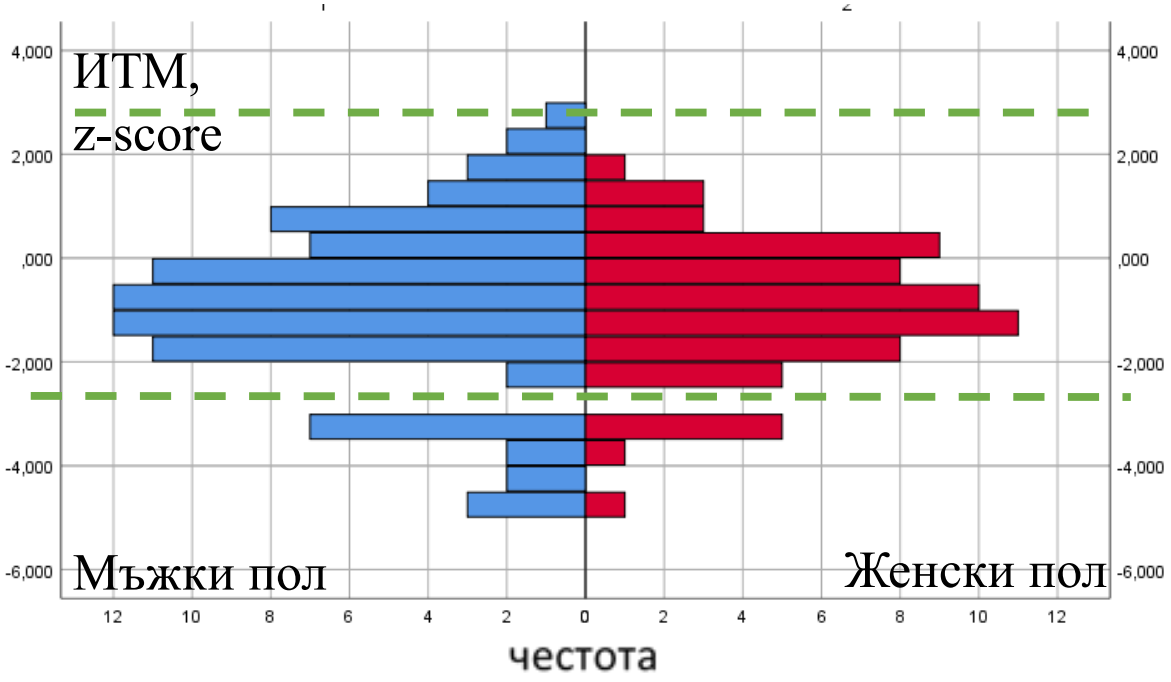
На следващите фигури са представени антропометричните показатели на пациентите от проучването и разпределението им по пол. Данните са за z-score (стандартни отклонения за възрастта) за тегло (Фигура 24), ръст (Фигура 25) и ИТМ (Фигура 26), и показват, че голяма част от пациентите са под –2,5 стандартни отклонения за теглото и по-малко за ръст.




Фигура 24. Антропометрични показатели – тегло.

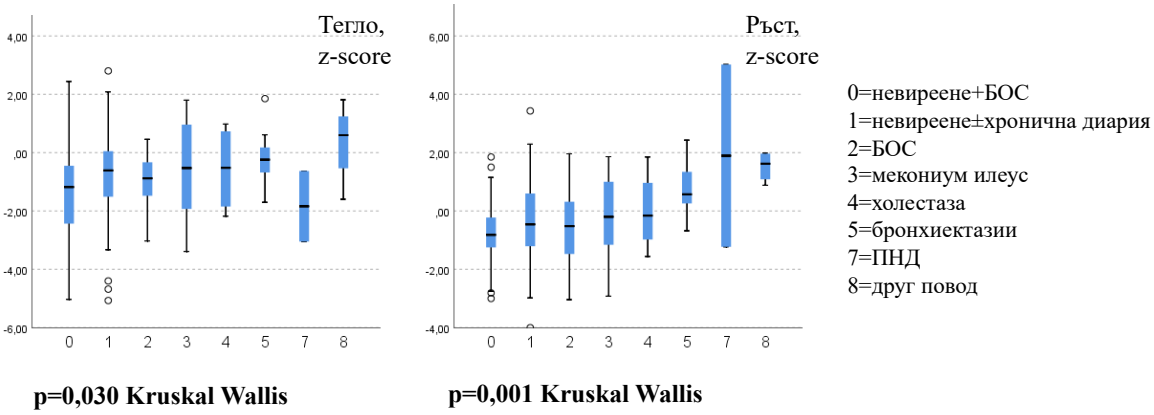



Фигура 25. Антропометрични показатели – ръст.




Фигура 26. Антропометрични показатели – ИТМ.

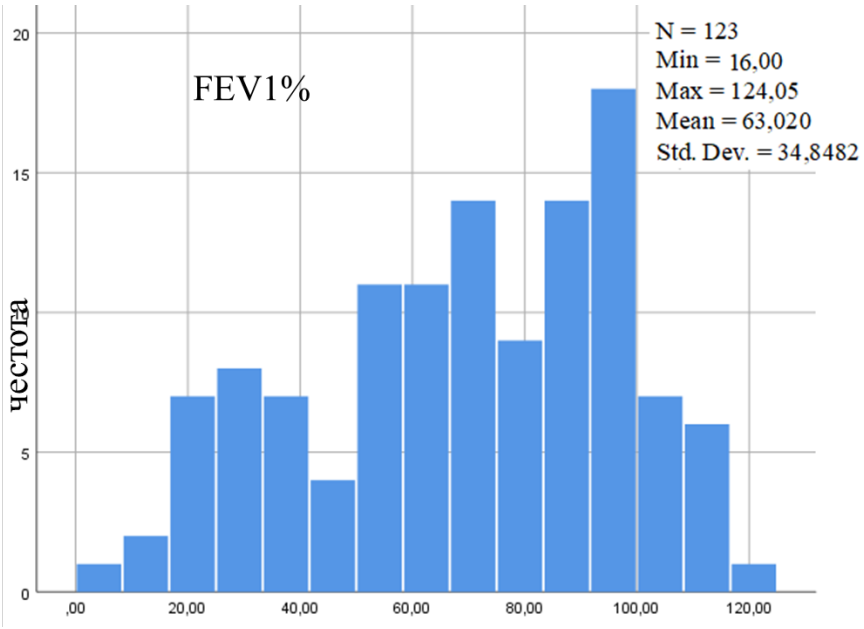
Антропометричните показатели (z-score за тегло и ръст) варират спрямо повода за поставяне на диагнозата, като в анализираната група разликите са статистически значими (Фигура 27).



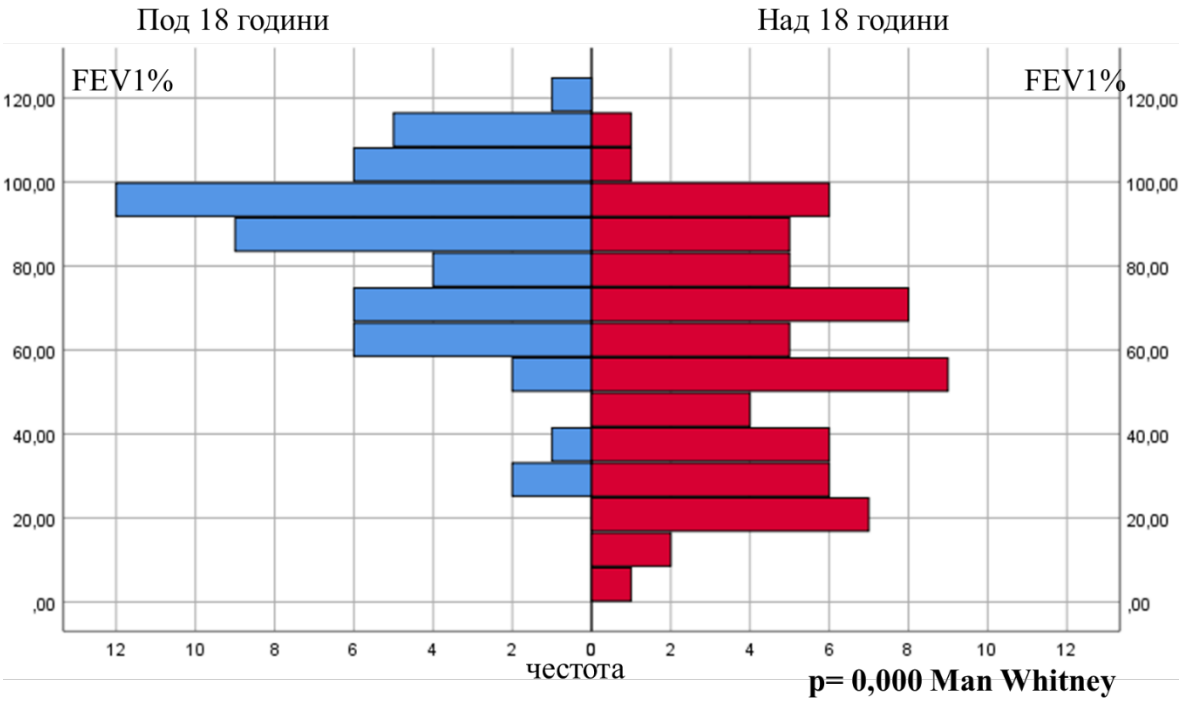

Фигура 27. Антропометрични показатели спрямо повода за диагноза.

На фигури 28 и 29 са представени данни за белодробната функция на пациентите, оценена чрез изследване на FEV1. Вижда се броя пациенти с различни стойности на показателя, като честотата на пациентите с нормални и почти нормални стойности е най-голяма

(Фигура 28). При сравняване на FEV1 по възраст прави впечатление, че очаквано белодробната функция на по-големите пациенти е по-влошена, което е знак за напреднало заболяване (Фигура 29).

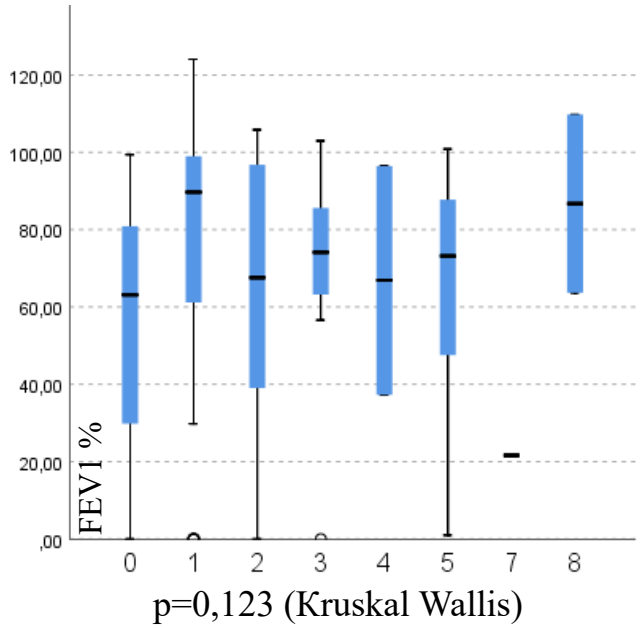



Фигура 28. Оценка на белодробната функция чрез FEV1 и честота на нарушенията по групи.




Фигура 29. Оценка на белодробната функция чрез FEV1 по възраст.

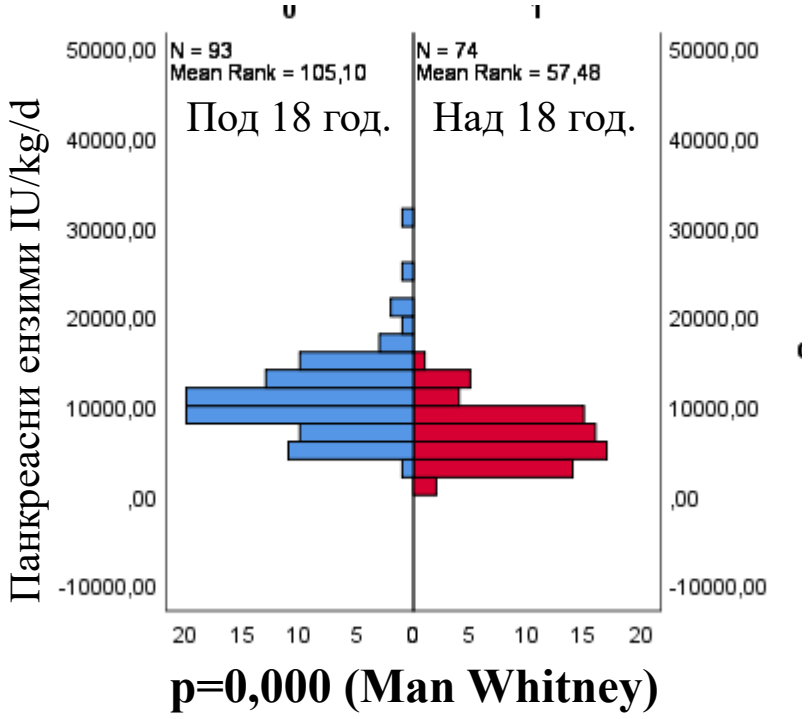
На фигура 30 е представена оценката на белодробната функция чрез FEV1 според повода за поставяне на диагнозата МВ. Вижда се, че белодробните показатели не зависят от повода на диагноза (Фигура 30).



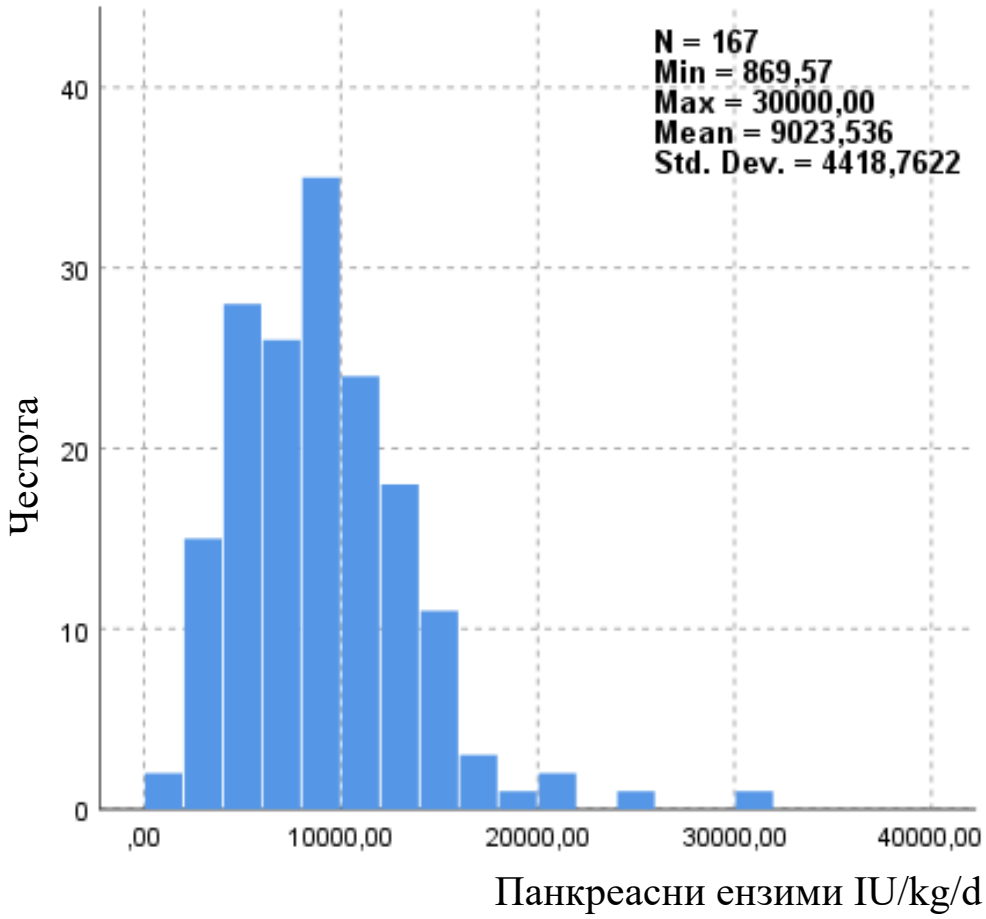

Фигура 30. Оценка на белодробната функция чрез FEV1 според повода за диагноза.

На фигура 31 е показана зависимост на дневните нужди от панкреасни ензими спрямо възрастта при деца и възрастни. При децата нуждите са по-големи, като разликата е статистически значима (Фигура 31). Максималната доза е била 30000 IU/kg/d, средно около 10000 IU/kg/d. От практиката можем да заключим, че пределно допустима доза няма и терапията се дозира според нуждите.

На следващата фигура нуждите от ензимзаместителна терапия са представени като честота. Най-голяма е популацията с нужди около средните, а именно 10000 IU/kg/d (Фигура 32).

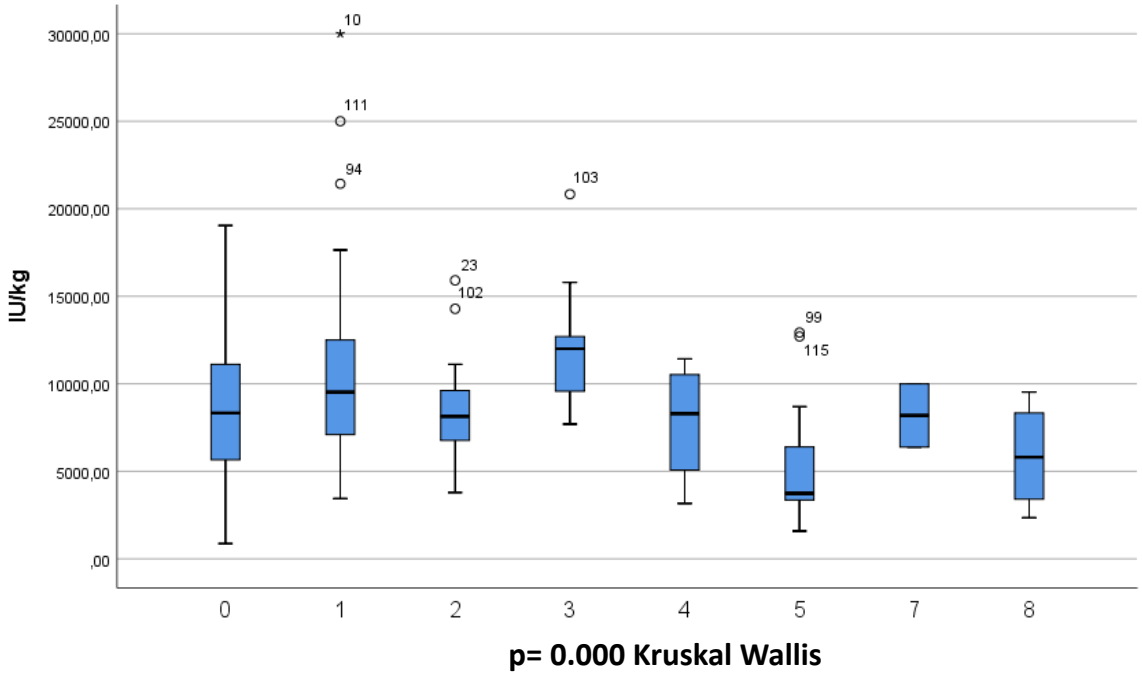



Фигура 31. Нужди от ензимзаместителна терапия по възраст (IU/kg/d).




Фигура 32. Нужди от ензимзаместителна терапия. Дозата на панкреасните ензими е представена в IU/kg/d.

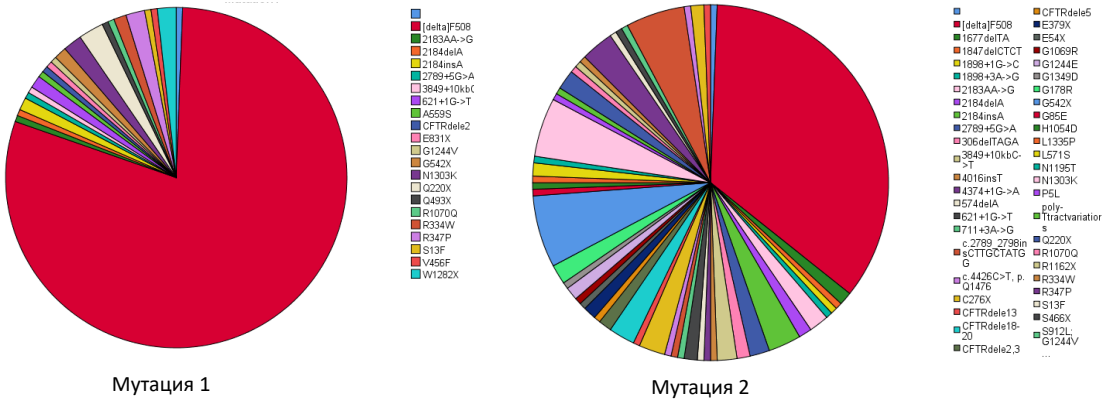
Интересни са данните за количеството ензими при различите групи в зависимост от повода за диагноза (Фигура 33). Най-високи са нуждите при пациенти с МИ, което отново потвърждава, че тази група е с по-тежко протичане, изразена екзокринна панкреасна инсуфициенция и висок риск за развитие на CFLD.



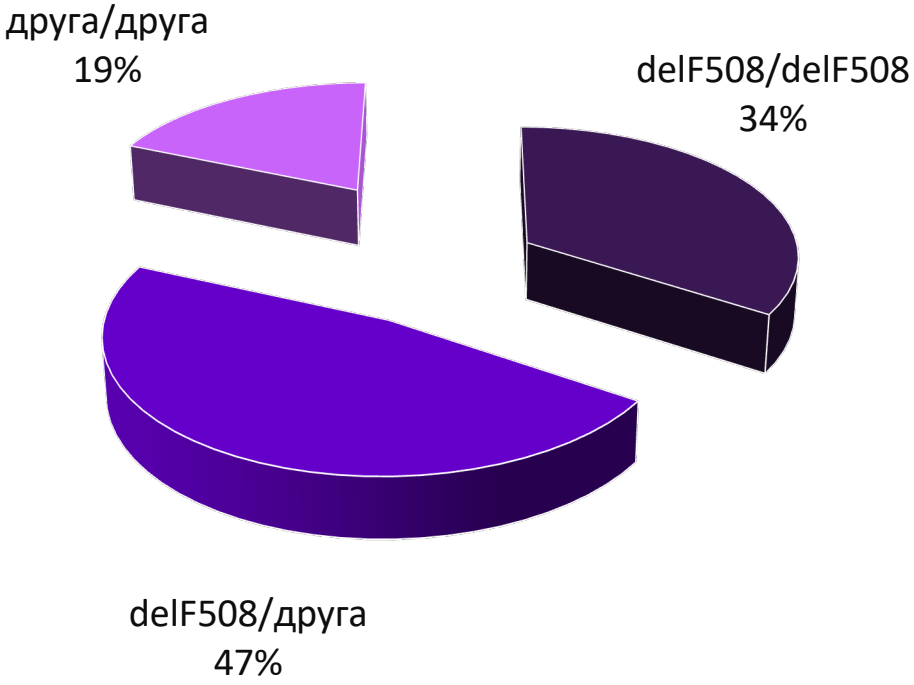

Фигура 33. Нужди от ензимзаместителна терапия. Количество ензими спрямо повода за диагноза. Дозата на панкреасните ензими е представена в IU/kg/d.

На следващите две фигури са представени резултати от молекулярно-генетичния анализ на пациентите в проучването (Фигура 34 и Фигура 35). На фигура 34 са дадени всички установени мутации при пациентите. Не е малка и групата болни, при които остава поне една неустановена до момента на анализа мутация. На фигура 35 са представени някои съотношения на мутациите в кохортата. Най-много са пациентите съставни хетерозиготи по една F508del и друга мутация, за разлика от Дания например, където над 90% са хомозиготите по F508del (255). Хомозиготите по F508del в изследваната група български пациенти са 34%. Съставните хетерозиготи по различни не-F508del мутации

съставляват останалите 19%. Тези данни са изключително важни с оглед включване на пациентите на терапия с CFTRm.




Фигура 34. Резултати от молекулярно-генетичен анализ.




Фигура 35. Резултати от молекулярно-генетичен анализ.

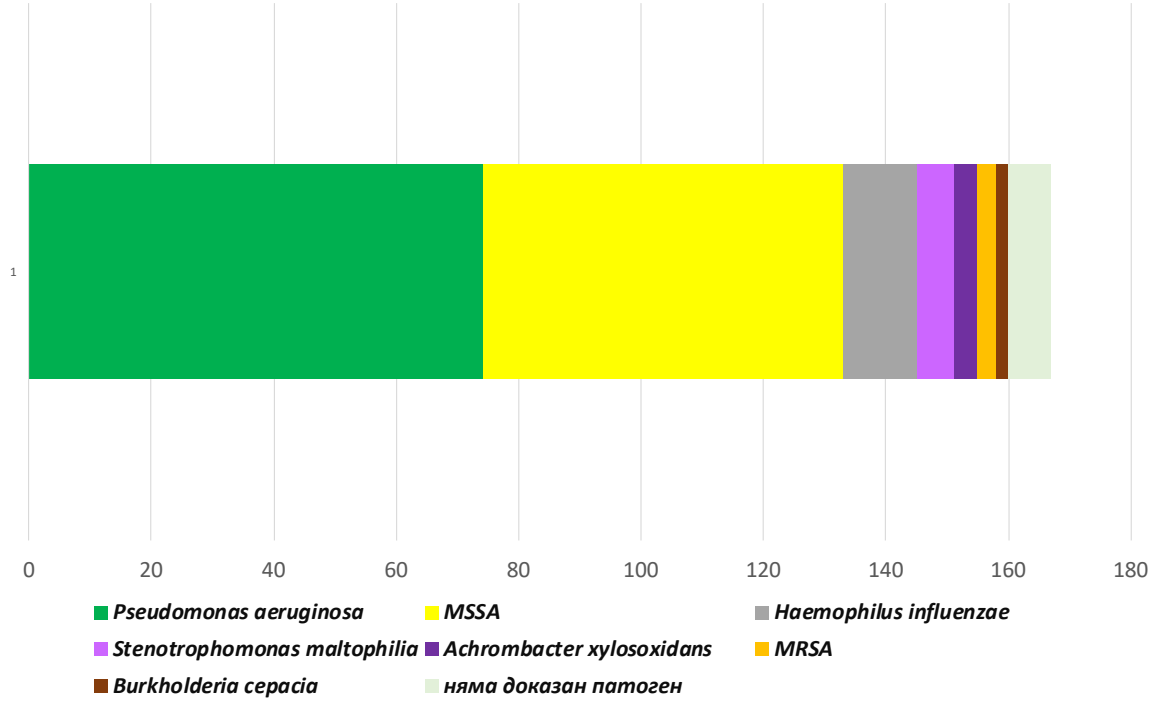
В таблица 8 са представени мутациите на пациентите и тяхното алелно представяне, както и процентното им съотношение в групата. За

F508del то е 57,78%, следвано от G542X – 3,89% и N1303K – 3,29% (Таблица 8).

| **Мутации** | **Брой алели** | **Процентно съотношение** |
|---|---|---|
| F508del | 193 | 57,78 |
| G542X | 13 | 3,89 |
| N1303K | 11 | 3,29 |
| R347P | 8 | 2,40 |
| Q220X | 7 | 2,10 |
| 2184insA | 7 | 2,10 |
| W1282X | 5 | 1,50 |
| 2183AA->G | 4 | 1,20 |
| del 18-20 | 4 | 1,20 |
| C276X | 4 | 1,20 |
| 2789+5G>A | 4 | 1,20 |
| 3849+10kbC->T | 4 | 1,20 |
| 621+1G->T | 4 | 1,20 |

Таблица 8. Най-чести мутации и алелно представяне в кохортата.

На фигура 36 и таблица 9 са представени резултати от микробиологично изследване на храчка и процентното съотношение на бактериалните щамове (Фигура 36 и Таблица 9). В най-голям процент очаквано се установява наличие на *Pseudomonas aeruginosa* (68/40,7%), следвано от *Methicillin sensitive staphylococcus aureus (MSSA)* (59/37%), *Haemophilus influenzae* (12/7,6%) и други. В много малък брой от случаите не се доказва патоген при проведеното микробиологично изследване. Повече момчета са с положителни резултати за патогени, характерни за МВ, но разликите не са статистически значими.

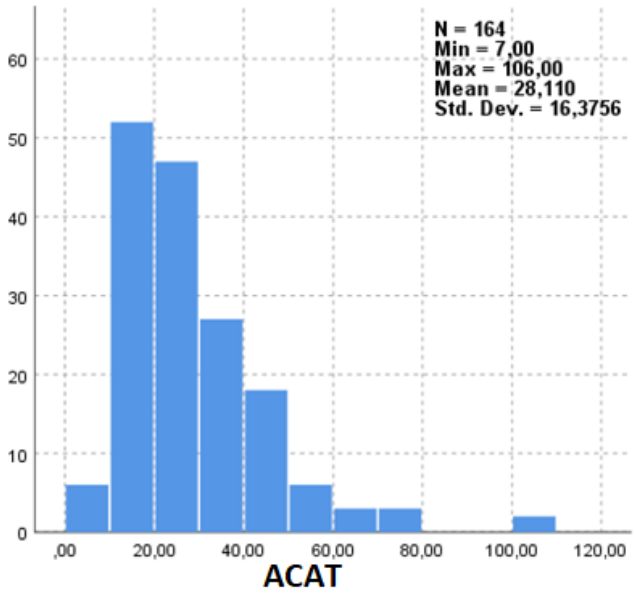



Фигура 36. Резултати от микробиологично изследване на храчка и процентно съотношение на бактериалните щамове.

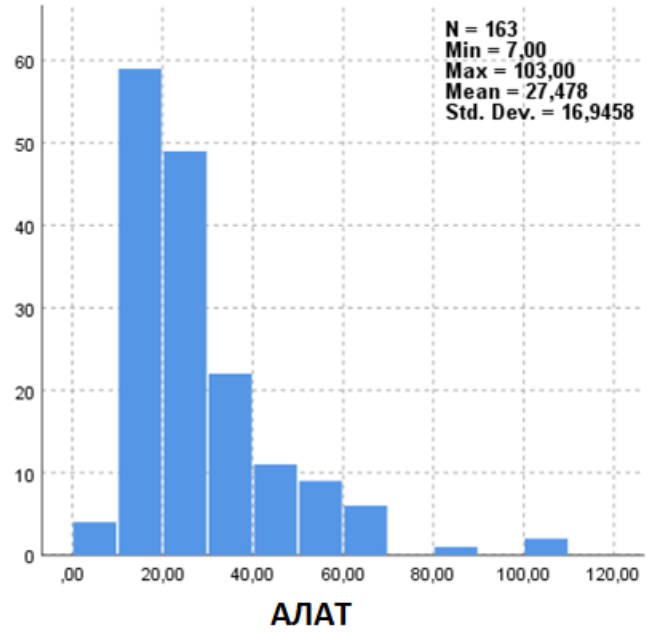
| | Да | Не | Момчета да | Момичета да | p (Chi-square) |
|---|---|---|---|---|---|
| *Pseudomonas aeruginosa* | 68 | 99 | 35 | 33 | 0,171 |
| *MSSA* | 59* | 109 | 35 | 24 | 0,691 |
| *интермитентно MSSA* | 17 | | 10 | 7 | 0,617 |
| *хроничен MSSA* | 42 | | 25 | 17 | 0,699 |
| *Haemophilus influenza* | 12 | 155 | 10 | 2 | 0,090 |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | 5 | 162 | 4 | 1 | 0,072 |
| *Achrombacter xylosoxidans* | 3 | 164 | 2 | 1 | 0,592 |
| *Burkholderia cepacia* | 1 | 166 | 1 | 0 | 0,569 |
| *MRSA* | 3 | 164 | 2 | 1 | 0,592 |
| *общо микробиологична позитивна проба* | 149 | 18 | 87 | 62 | 0,610 |

Таблица 9. Микробиологични резултати на пациентите и полово разпределение.

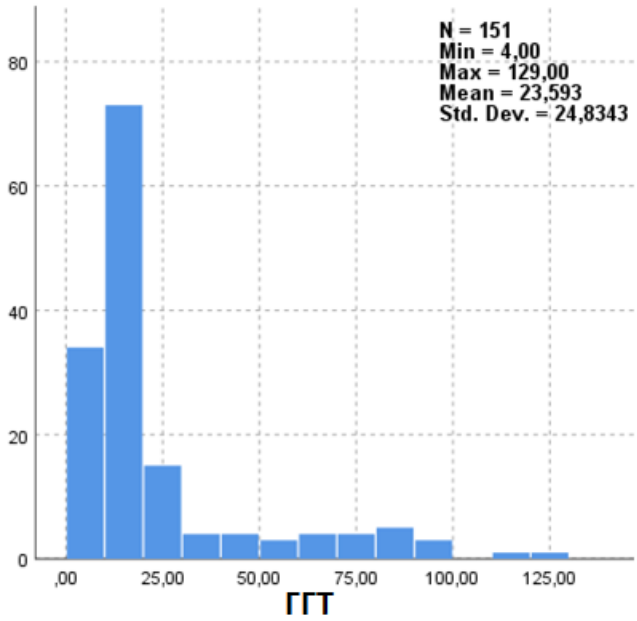
На следващите три фигури са представени графики с лабораторните показатели АСАТ (Фигура 37), АЛАТ (Фигура 38) и ГГТ (Фигура 39). Вижда се броят изследвани пациенти (N), както и минимална, максимална и средна стойност на съответния показател. Повечето пациенти са с нормални показатели за АСАТ, АЛАТ и ГГТ.




Фигура 37. Лабораторни показатели – АСАТ.




Фигура 38. Лабораторни показатели – АЛАТ.




Фигура 39. Лабораторни показатели – ГГТ.

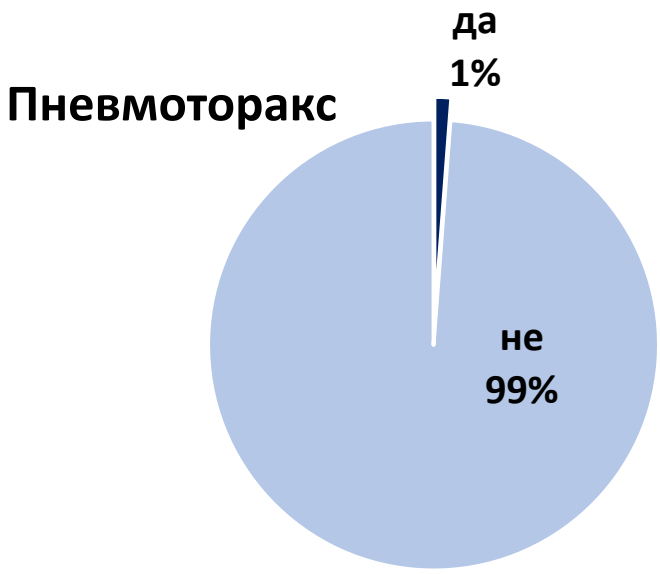
На следващите четири фигури (Фигури 40-43) са показани някои усложнения при пациентите с МВ и процентното им съотношение от общата група пациенти. Представени са последователно хемоптиза (кръвохрак) (Фигура 40), пневмоторакс (Фигура 41), диабет (Фигура 42) и алергична бронхопулмонална аспергилоза (АБПА) (Фигура 43). В кохортата има и една пациентка с аденокарцином, която не може да обособи отделна графика.

Пациентите с МИ и CFLD ще бъдат разгледани отделно и задълбочено във връзка с основната тема и цел на дисертационния труд.

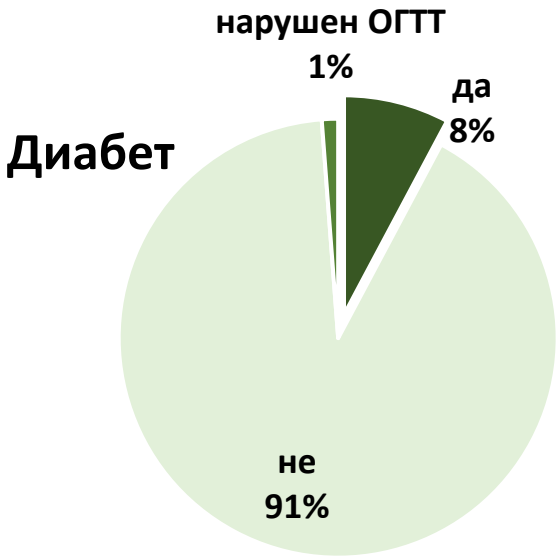
По-детайлно в резултатите, след което и в дискусия, ще разгледаме значението на диабета и кръвохрака (хемоптиза) при пациентите с МВ, както и ролята им при CFLD с анализ на някои чернодробни показатели. Броят на пациентите в тези групи е достатъчен за извършване на по-достоверен статистически анализ.



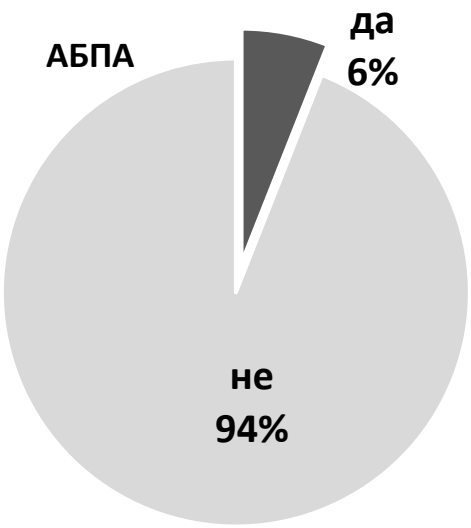

Фигура 40. Усложнения при МВ – хемоптиза.




Фигура 41. Усложнения при МВ – пневмоторакс.

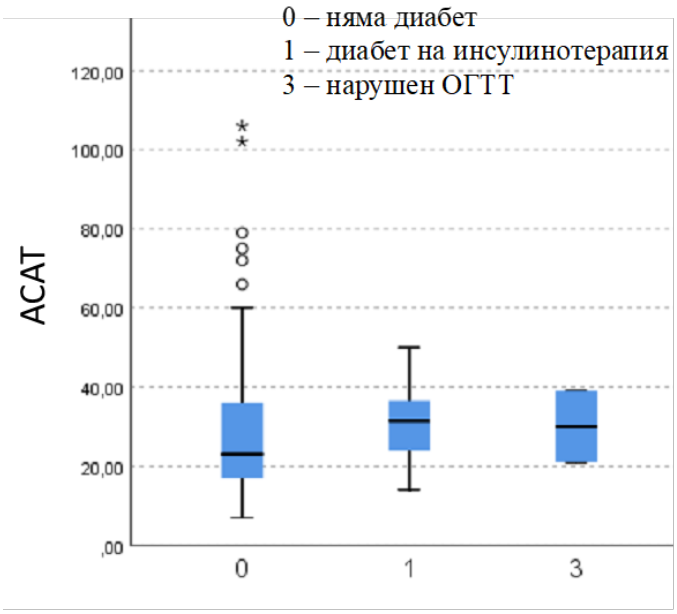



Фигура 42. Усложнения при МВ – диабет.



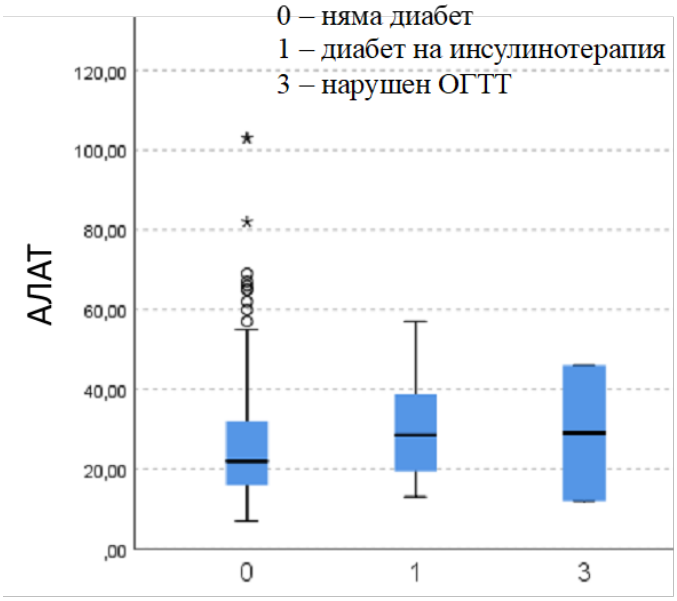

Фигура 43. Усложнения при МВ – АБПА.

На фигури 44-46 сравнително са представени някои чернодробни показатели при пациенти с МВ без диабет, с диабет, провеждащи инсулинотерапия, и с нарушен глюкозен толеранс (абнормен орален глюкозотолерантен тест (ОГТТ). Показани са данните за АСАТ (Фигура 44), АЛАТ (Фигура 45) и ГГТ (Фигура 46) в посочените групи.




p=0,350 (Kruskal Wallis)

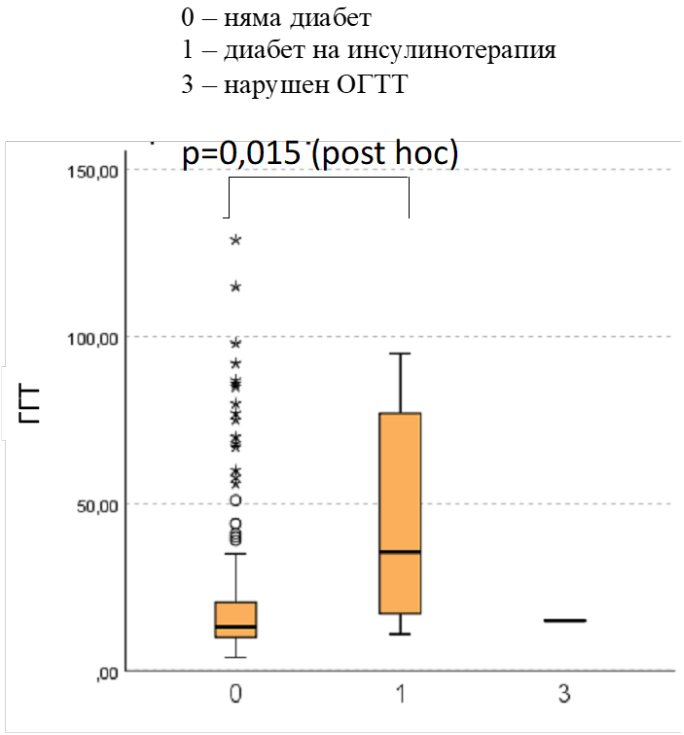
Фигура 44. Стойности на АСАТ при пациенти с МВ без диабет, с диабет, провеждащи инсулинотерапия, и с нарушен глюкозен толеранс.




p=0,300 (Kruskal Wallis)

Фигура 45. Стойности на АЛАТ при пациенти с МВ без диабет, с диабет, провеждащи инсулинотерапия, и с нарушен глюкозен толеранс.

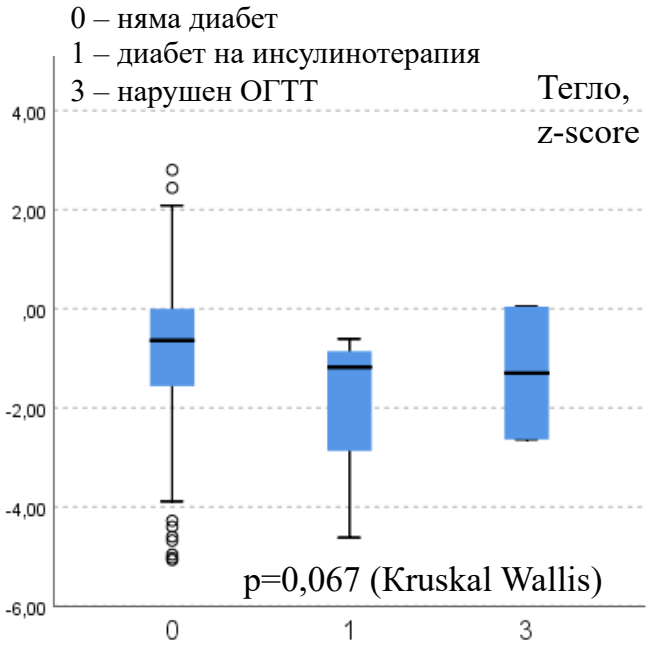
Видно е, че само стойностите на ГГТ са различни в групите, като диабетиците са с по-високи стойности. Възможни фактори могат да бъдат прием на медикаменти, степен на дехидратация, наличие на съпътстваща холестаза и други, когато е налице покачване на ГГТ. Още тук може да бъде направен извода, че при установяване на повишени стойности на ГГТ, пациентите с МВ следва да се насочват за ОГТТ и оценка на статуса.



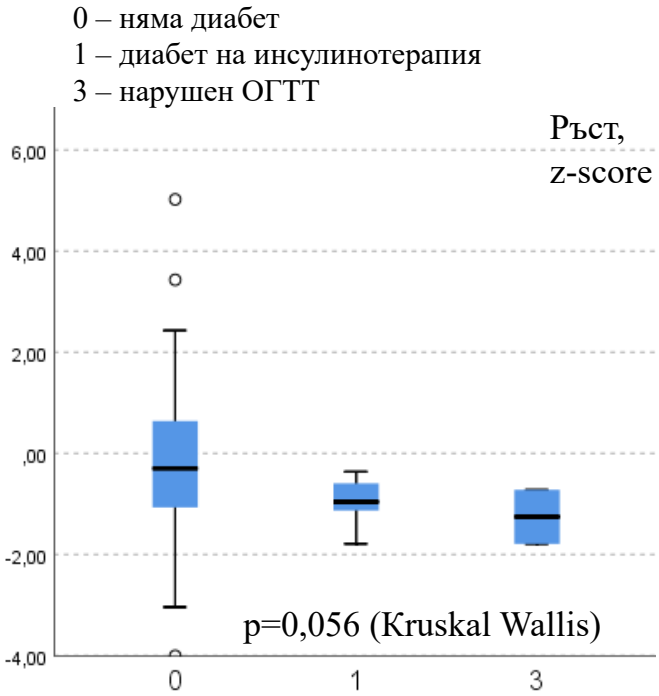

Фигура 46. Стойности на ГГТ при пациенти с МВ без диабет, с диабет, провеждащи инсулинотерапия, и с нарушен глюкозен толеранс.

На следващите фигури 47-50 е представено значението на диабета при пациентите с МВ и връзката му с показатели като тегло, ръст, FEV1 и възраст. За теглото и ръста не се установява сигнификантна разлика, но може да се приеме като тенденция диабетните пациенти и тези с нарушен ОГТТ да са с по-ниски тегло и ръст в сравнение с останалите (Фигура 47 и Фигура 48). Прави впечатление, че пациентите с диабет са

с по-ниски показатели от ФИД, което води до по-лоша прогноза, и се свързва с по-голяма давност на МВ (Фигура 49 и Фигура 50).

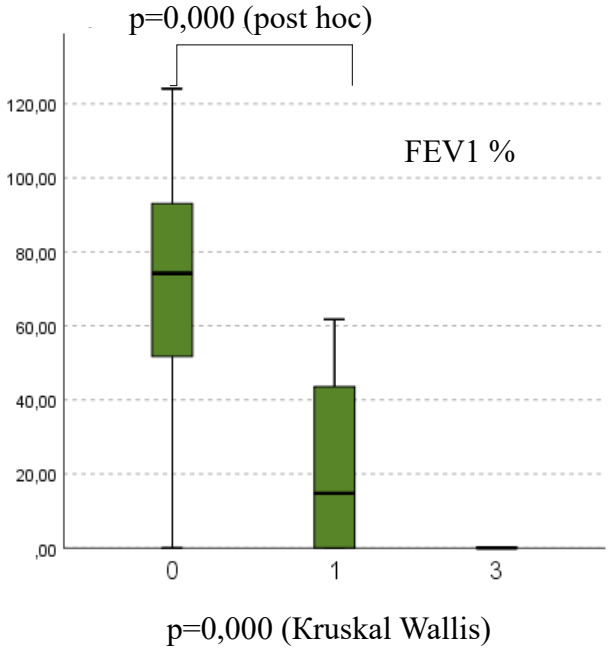



Фигура 47. Значение на диабета за теглото на пациенти с МВ.



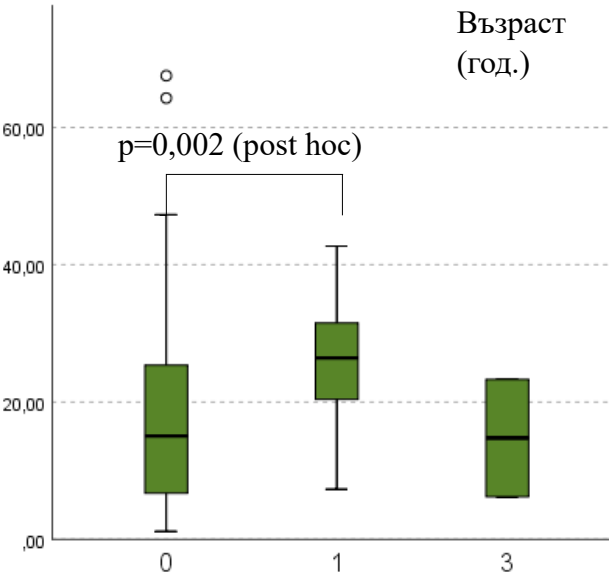

Фигура 48. Значение на диабета за ръста на пациенти с МВ.

0 – няма диабет
1 – диабет на инсулинотерапия
3 – нарушен ОГТТ



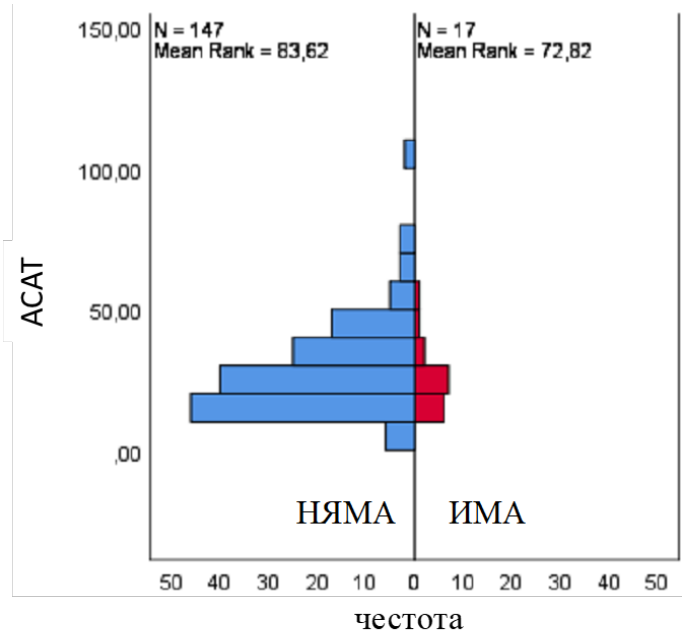

Фигура 49. Значение на диабета за FEV1 на пациенти с МВ.

0 – няма диабет
1 – диабет на инсулинотерапия
3 – нарушен ОГТТ




Фигура 50. Корелации между наличието на диабет и възрастта при пациенти с МВ.

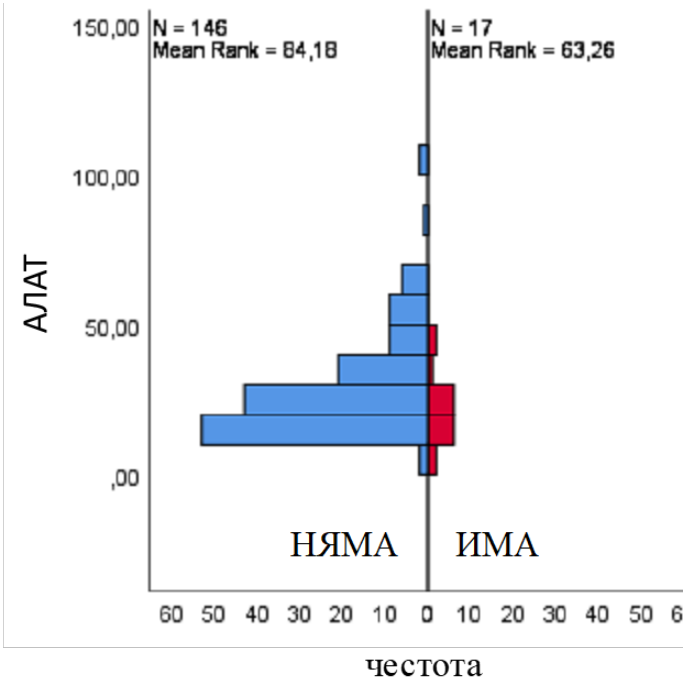
На фигури 51-53 сравнително са представени някои чернодробни показатели при пациенти с МВ с/без кръвохрак. Показани са данните за АСАТ (Фигура 51), АЛАТ (Фигура 52) и ГГТ (Фигура 53) в посочените две групи. Видно е, че няма сигнификантни разлики. Често кръвохрак се свързва с напреднало заболяване и бронхиектазии, и донякъде с нарушена чернодробна функция (коагулопатия, дефицит на витамин К), но данните от графиките не са статистически значими.




p=0,37 (Man Whitney)

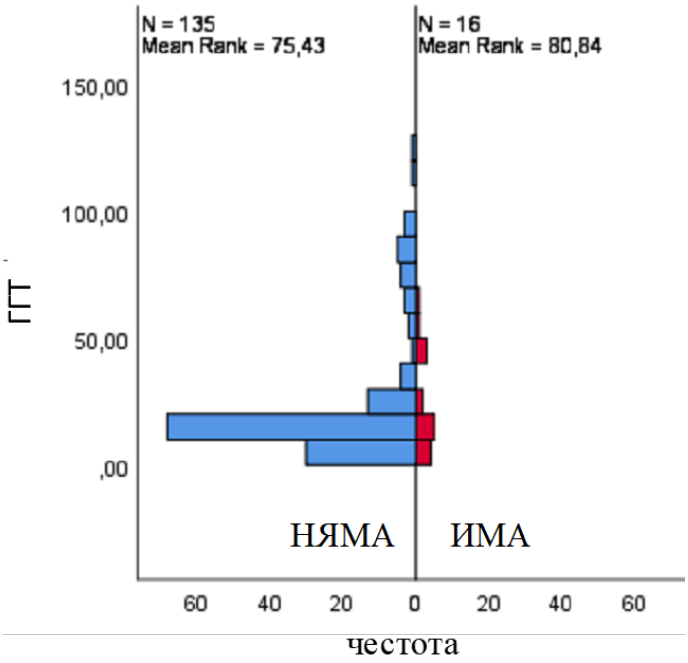
Фигура 51. Стойности на АСАТ при пациенти с МВ с/без кръвохрак.

На следващите фигури 54-57 е представено значението на кръвохрака при пациентите с МВ и връзката му с показатели като тегло, ръст, FEV1 и възраст. Не се установява статистически значима разлика. Прави впечатление, че пациентите с кръвохрак са с по-ниско тегло (Фигура 54), но за ръста това не се установява (Фигура 55). FEV1 не показва значими разлики или тенденции (Фигура 56), но на последната графика се вижда, че на по-голяма възраст по-често пациентите са с кръвохрак (Фигура 57).



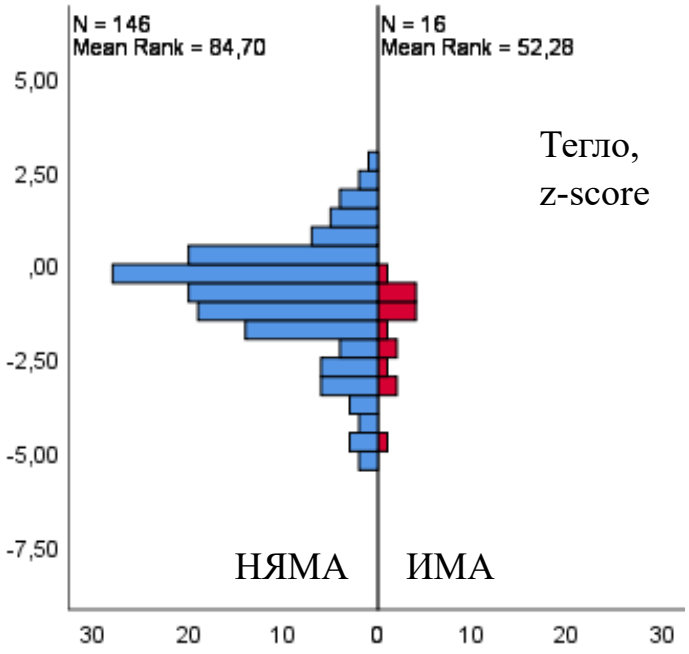

p=0,084 (Man Whitney)

Фигура 52. Стойности на АЛАТ при пациенти с МВ с/без кръвохрак.



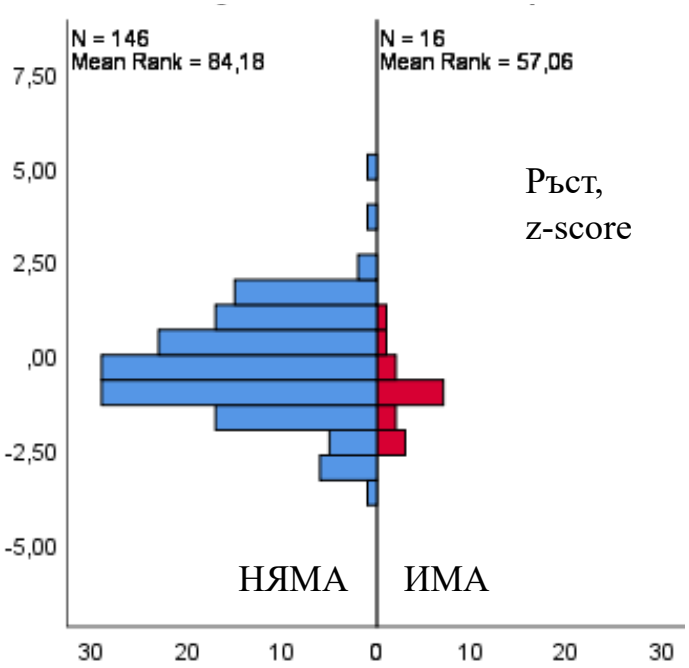

p=0,63 (Man Whitney)

Фигура 53. Стойности на ГГТ при пациенти с МВ с/без кръвохрак.



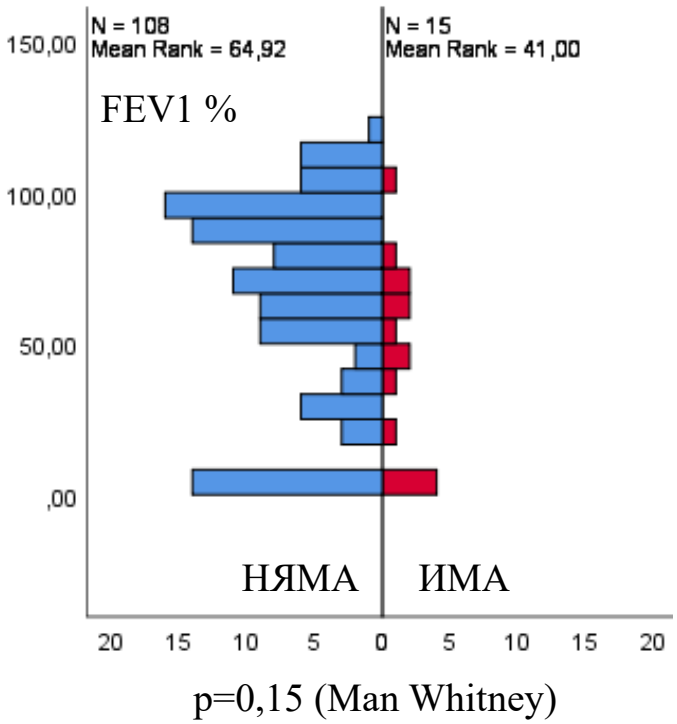

p=0,09 (Man Whitney)

Фигура 54. Значение на кръвохрака за теглото на пациенти с МВ.

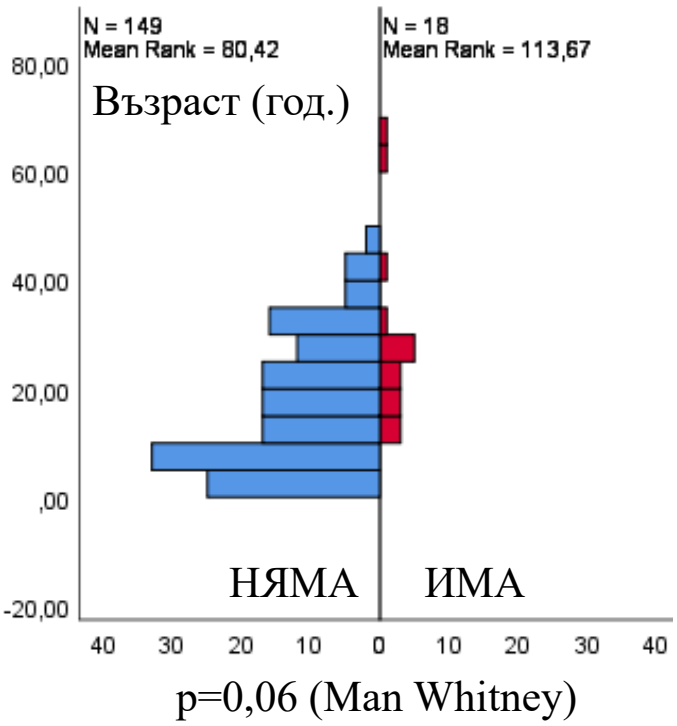



p=0,28 (Man Whitney)

Фигура 55. Значение на кръвохрака за ръста на пациенти с МВ.




Фигура 56. Значение на кръвохрака за FEV1 на пациенти с МВ.

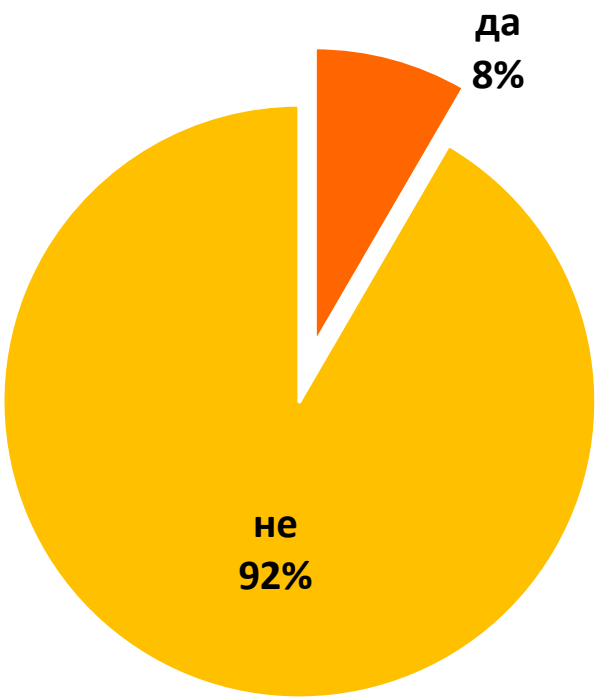



Фигура 57. Корелации между наличието на кръвохрак и възрастта при пациенти с МВ.

.

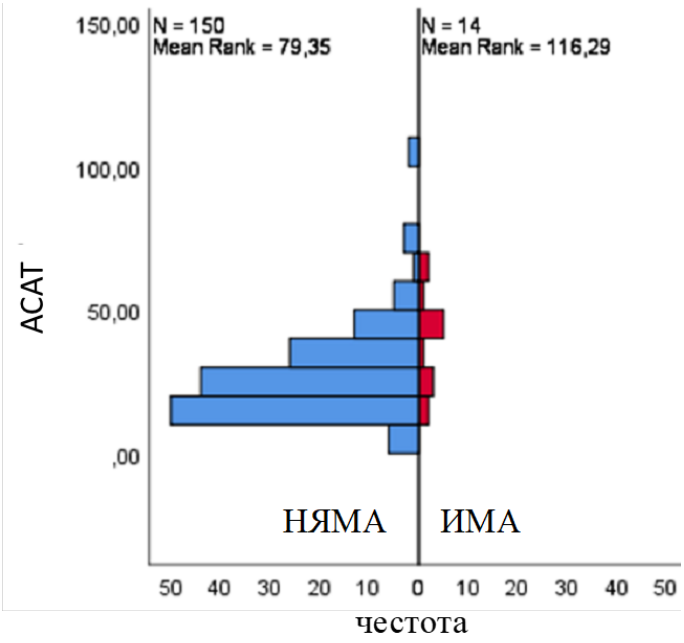
На следващите няколко фигури са представени данни за пациентите с МИ и CFLD, които са във връзка с основната тема и цел на дисертационния труд.

На фигура 58 е представена честотата на МИ при пациентите с МВ. Броят им в нашата кохорта е 14, което е 8% от случаите (Фигура 58).



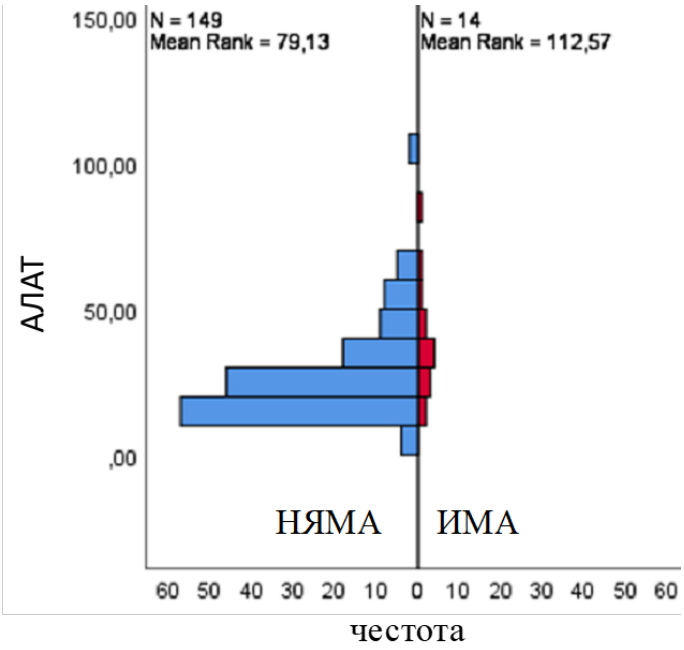

Фигура 58. Честота на МИ при пациенти с МВ.

На фигури 59-61 сравнително са представени някои чернодробни показатели при пациенти с МВ с/без МИ. Показани са данните за АСАТ (Фигура 59), АЛАТ (Фигура 60) и ГГТ (Фигура 61) в посочените две групи. Прави впечатление, че стойностите на АСАТ и АЛАТ са по-високи (статистически значимо), което дава възможност да се направи извода, че е задължително проследяването за CFLD при тези пациенти.



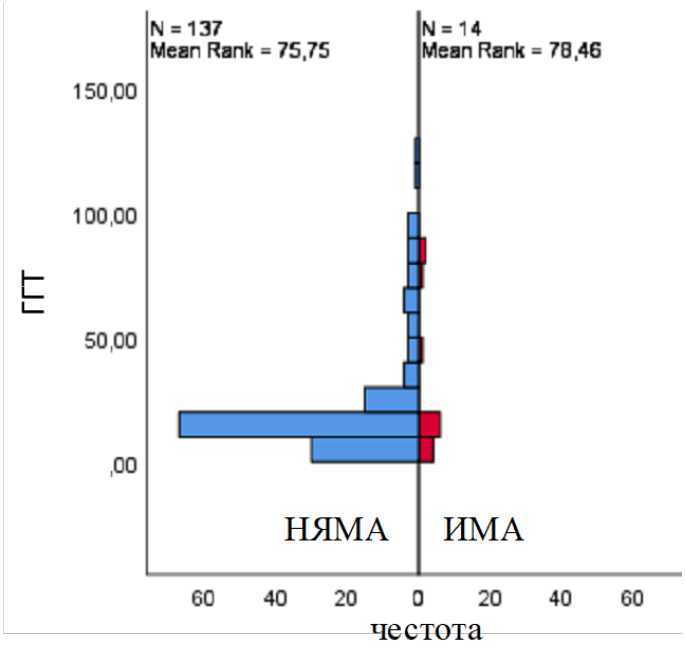

p=0,005 (Man Whitney)

Фигура 59. Стойности на АСАТ при пациенти с МВ с/без МИ.




p=0,011 (Man Whitney)

Фигура 60. Стойности на АЛАТ при пациенти с МВ с/без МИ.

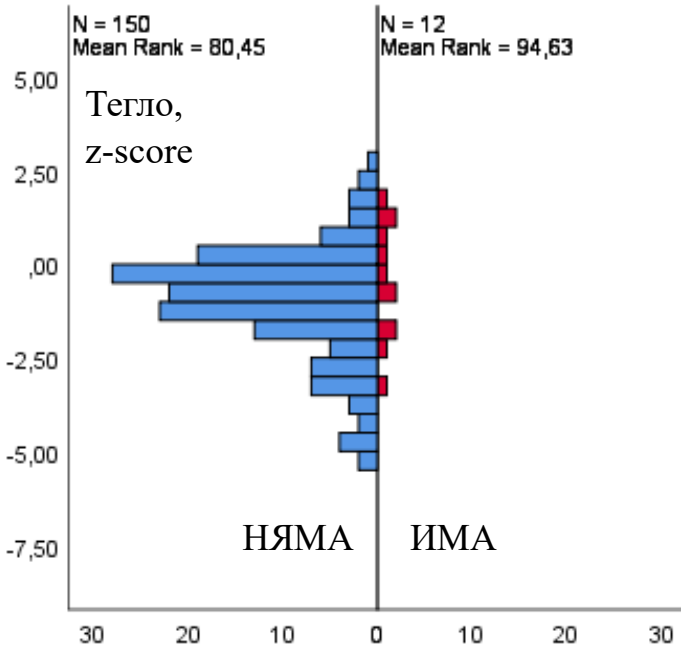



p=0,22 (Man Whitney)

Фигура 61. Стойности на ГГТ при пациенти с МВ с/без МИ.

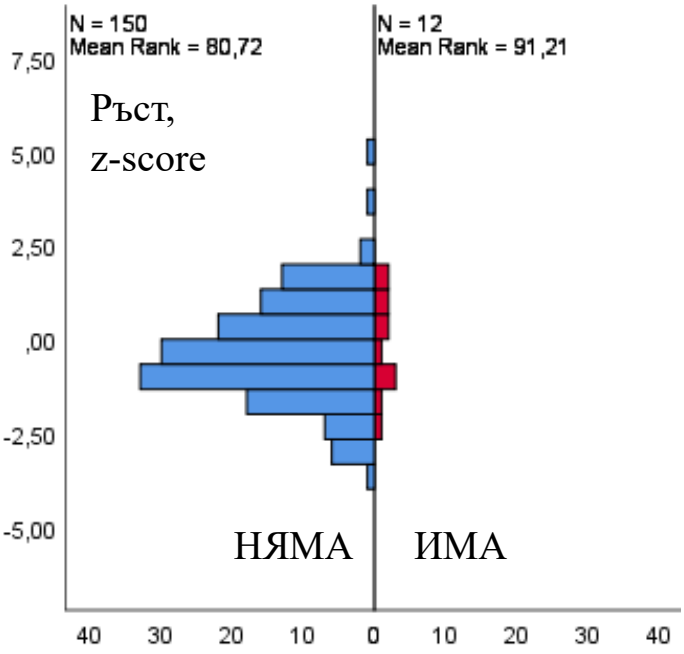
На следващите фигури 62-64 е представено значението на МИ при пациентите с МВ и връзката му с показатели като тегло и ръст. Допълнително се анализират и дозите на ензими при тези пациенти. Не се установява статистически значима разлика за теглото и ръста (Фигура 62 и Фигура 63), но това е за сметка на много по-високи дози ензимзаместителна терапия (Фигура 64). Можем да направим извода, че за децата с МИ са необходими по-високи дози на ензимите за осигуряване на оптимален растеж и развитие, а оттам и по-добра прогноза за заболяването.

Допълнителен анализ е направен и на пациентите с МИ и МВ и възрастта им на диагностициране, проследяване и смърт (Фигура 65, Фигура 66 и Фигура 67). И трите категории са значително по-ниски при МИ. Може да се направи извода за по-ранна смърт при пациентите с МИ, което може да се използва като прогностичен маркер.



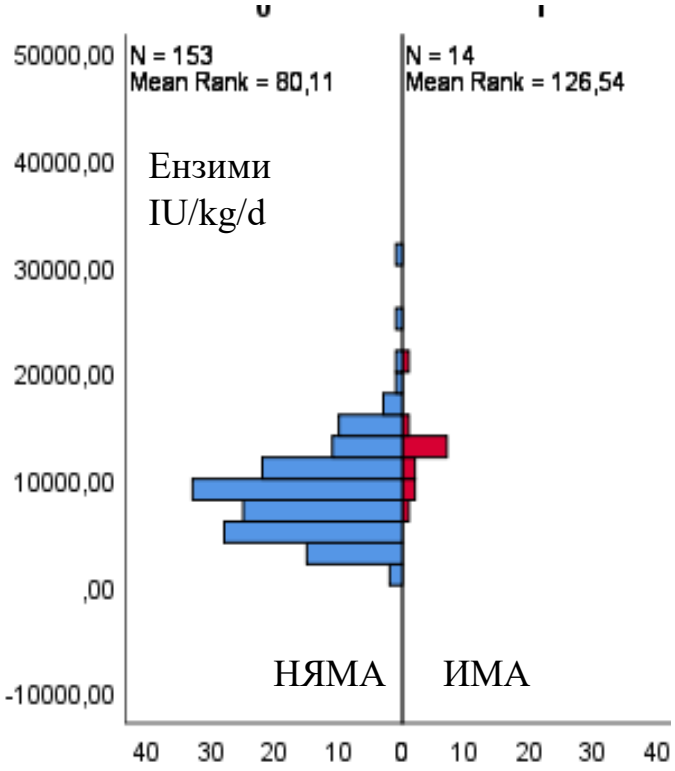

p=0,314 (Man Whitney)

Фигура 62. Значение на МИ за теглото на пациенти с МВ.




p=0,456 (Man Whitney)

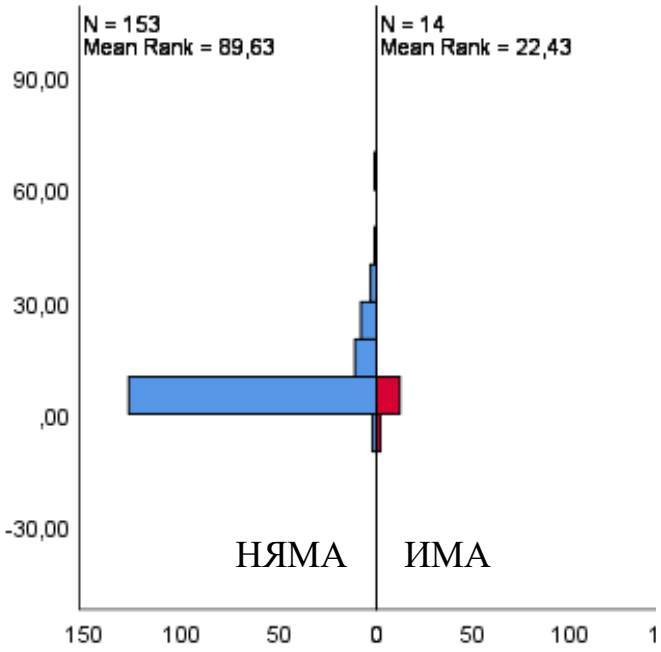
Фигура 63. Значение на МИ за ръста на пациенти с МВ.




p=0,000 (Man Whitney)

Фигура 64. Значение на дозата ензимзаместителна терапия при МИ и МВ.

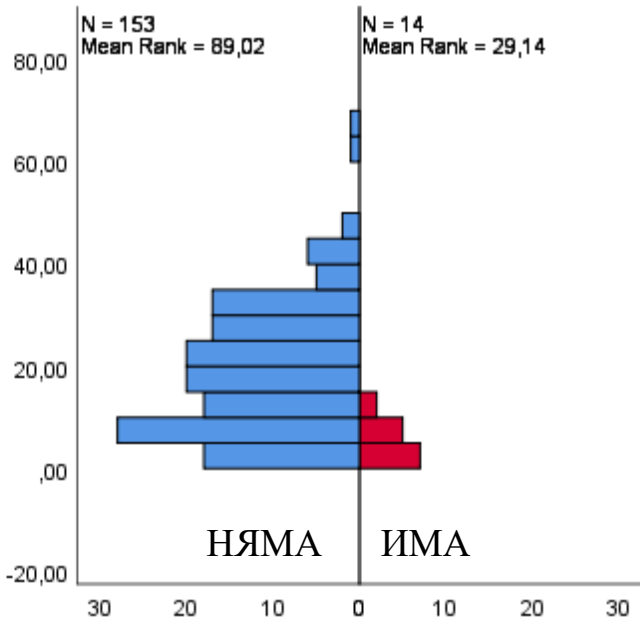
**диагноза**




p=0,000 (Man Whitney)

Фигура 65. МИ и възраст на диагностициране на пациентите с МВ.

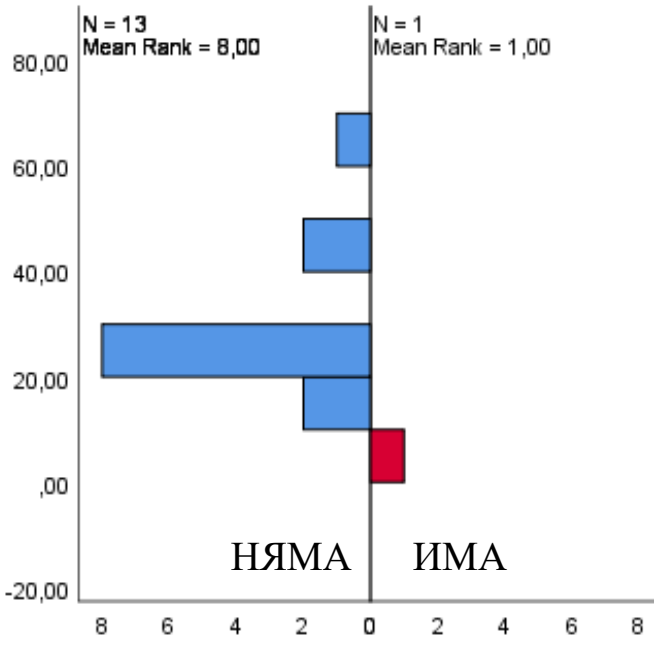
**проследяване**




p=0,000 (Man Whitney)

Фигура 66. МИ и възраст на проследяване на пациентите с МВ.

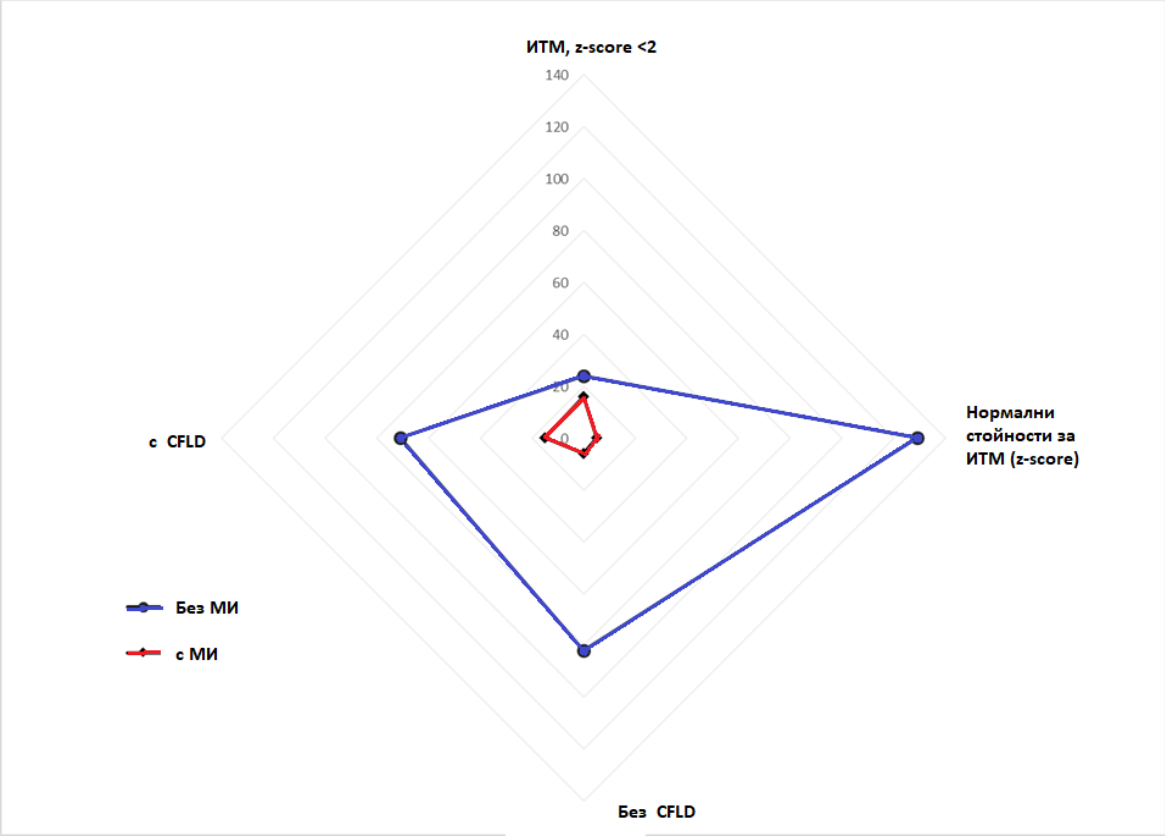
**смърт**




p=0,000 (Man Whitney)

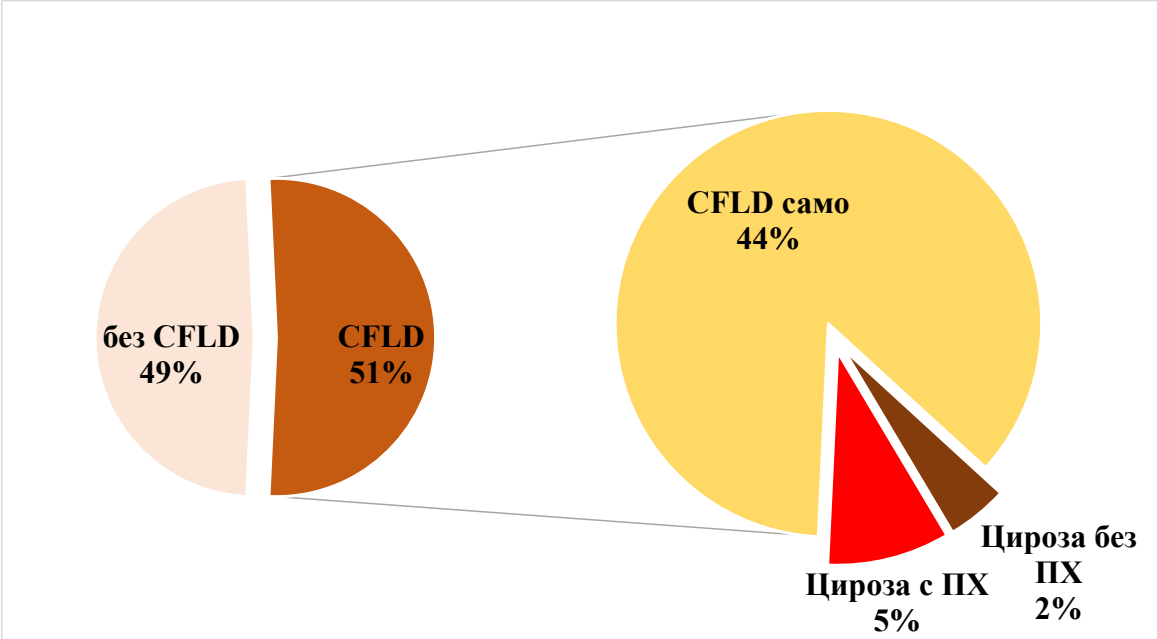
Фигура 67. МИ и възраст на настъпване на смърт при пациентите с МВ.

Направен е и анализ на пациентите с и без МИ съобразно нутритивния им статус (ИТН, z-score) и наличието на чернодробно засягане (фигура 68). Пациентите с МИ са с по-голяма честота на нисък ИТМ и/или CFLD (p=0,031498 за наличие на CFLD и p<0,0001 за нисък ИТМ z-score, Chi square).




Фигура 68. Радарна диаграма на броя на децата с или без МИ според наличието на ниско тегло и/или CFLD.

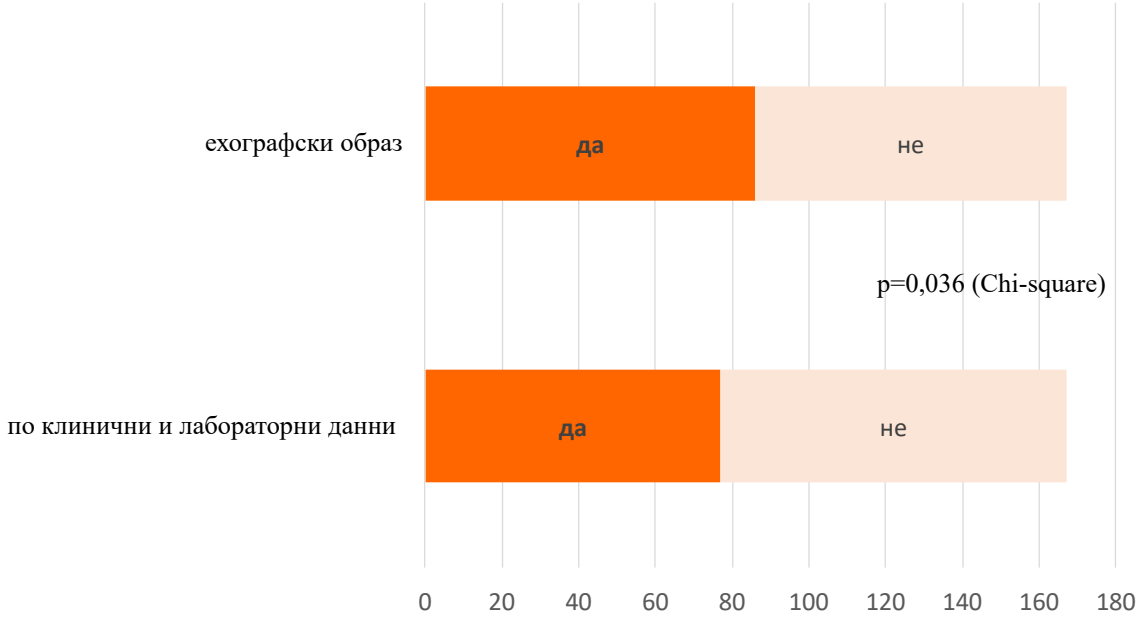
На фигура 69 е представена честотата на CFLD в изследваната кохорта пациенти с МВ, която е 51%. Виждат се и видовете чернодробно увреждане – CFLD без цироза, CFLD с цироза без портална хипертония (ПХ) и CFLD с цироза и ПХ, според международно приетите стандарти (Фигура 69).



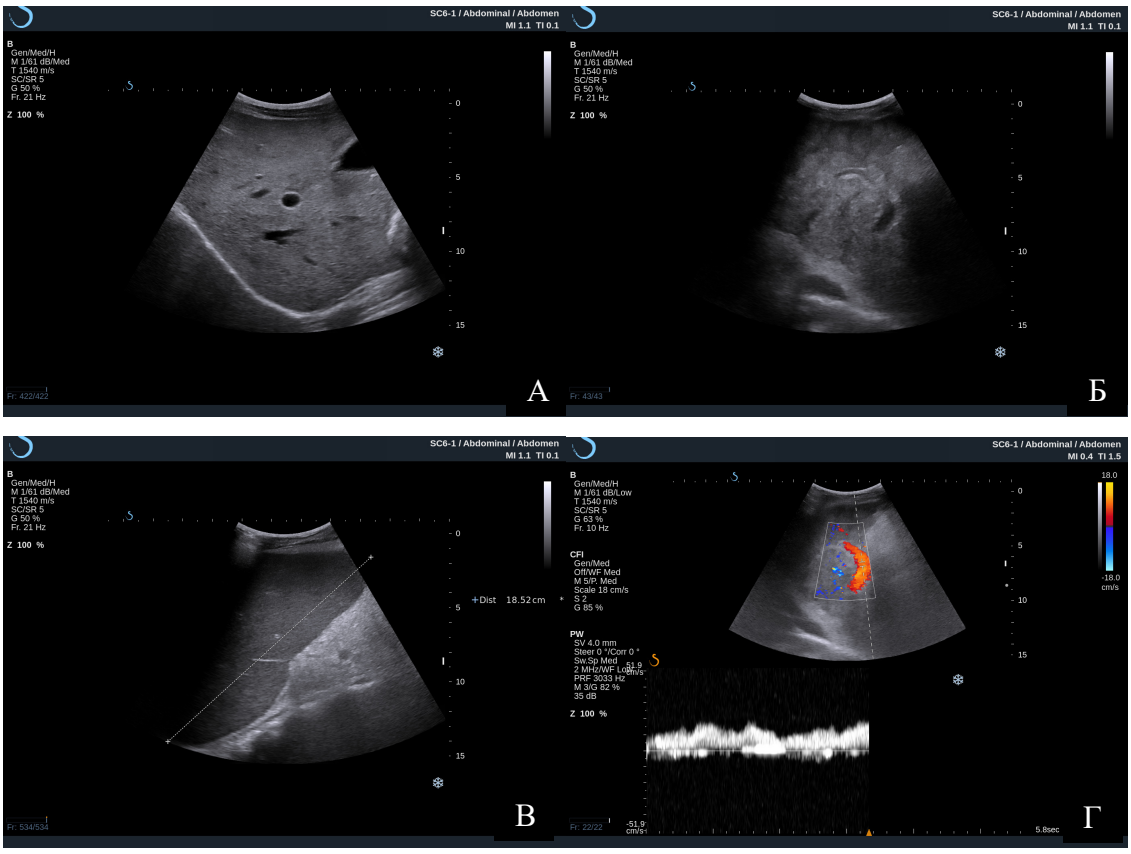

Фигура 69. CFLD и видове чернодробно увреждане при пациентите с МВ.

Проследяването на пациентите с CFLD включва различни методи, но ехографското изследване е основно. На фигура 70 е представен сравнителен анализ на диагностичните възможности – ехография срещу клинични и лабораторни данни (Фигура 70). Ехографското изследване е с много по-голяма диагностична стойност (статистически значима) и е задължително при проследяване на пациентите с МВ за ранно откриване и мониториране на CFLD.

На снимка 2 са представени ехографски находки от проучванията, които показват различна структура на черния дроб при CFLD, спленомегалия при ПХ, Доплер изследване на съдовете за оценка степента на CFLD (Снимка 2).

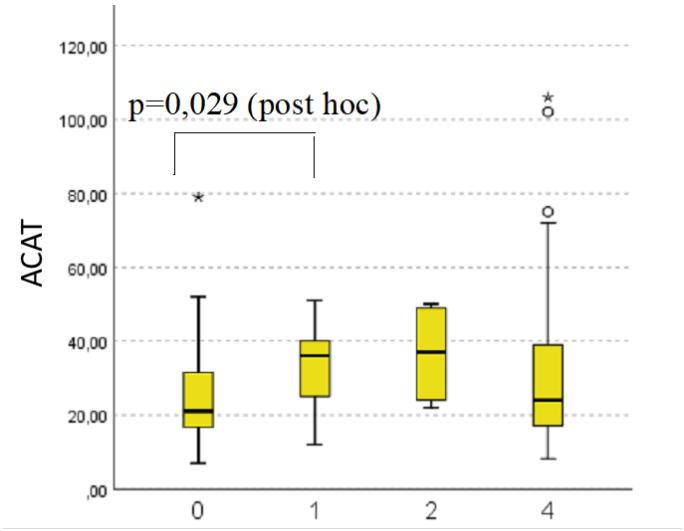



Фигура 70. Методи на проследяване на пациентите с CFLD.




Снимка 2. Ехография на коремни органи при CFLD: А. Хомогенна, хиперехогенна структура на черния дроб при CFLD без цироза; Б. Циротична конфигурация на черния дроб; В. Уголемена слезка, спленомегалия при напреднало CFLD с ПХ; Г. Начална ПХ с увеличен размер на вена порте, запазен кръвоток.

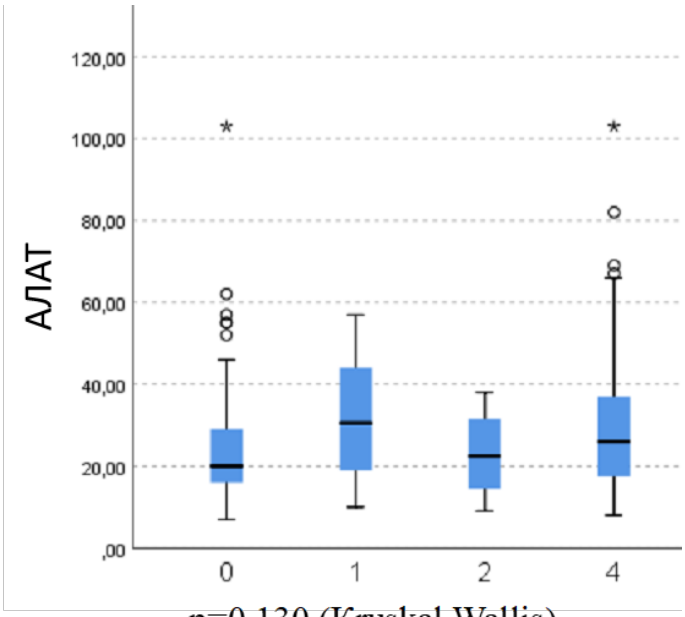
На фигури 71-74 сравнително са представени някои чернодробни показатели при пациенти с CFLD. Показани са данните за АСАТ (Фигура 71), АЛАТ (Фигура 72), ГГТ (Фигура 73) и билирубин (Фигура 74) в посочените групи – без CFLD (0), CFLD (цироза + ПХ) (1), CFLD (цироза - ПХ) (2) и само CFLD (4). Средните стойности и стандартното отклонение на посочените показатели спрямо групата с чернодробно засягане са представени на таблица 10. Не се установява статистически значима разлика между стойностите на АЛАТ в различните групи, но такава е налична за всички други показатели.




p=0,034 (Kruskal Wallis)

0 – без CFLD
1 - CFLD (цироза + ПХ)
2 - CFLD (цироза - ПХ)
4 - CFLD

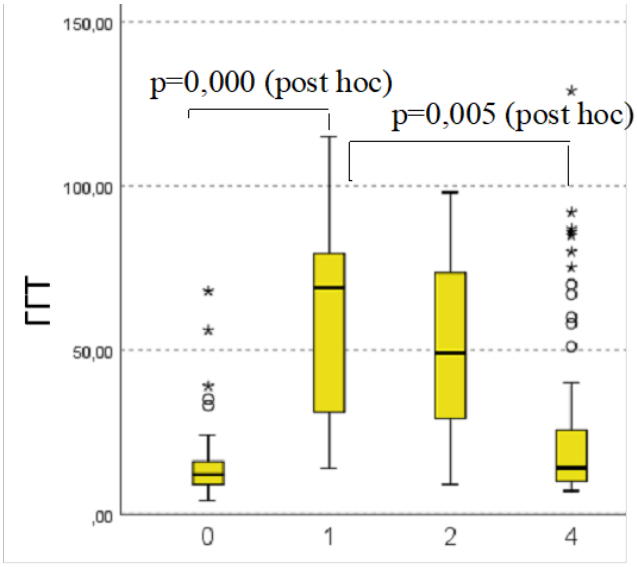
Фигура 71. Стойности на АСАТ при пациенти с/без CFLD.




p=0,130 (Kruskal Wallis)

0 – без CFLD
1 - CFLD (цироза + ПХ)
2 - CFLD (цироза - ПХ)
4 - CFLD

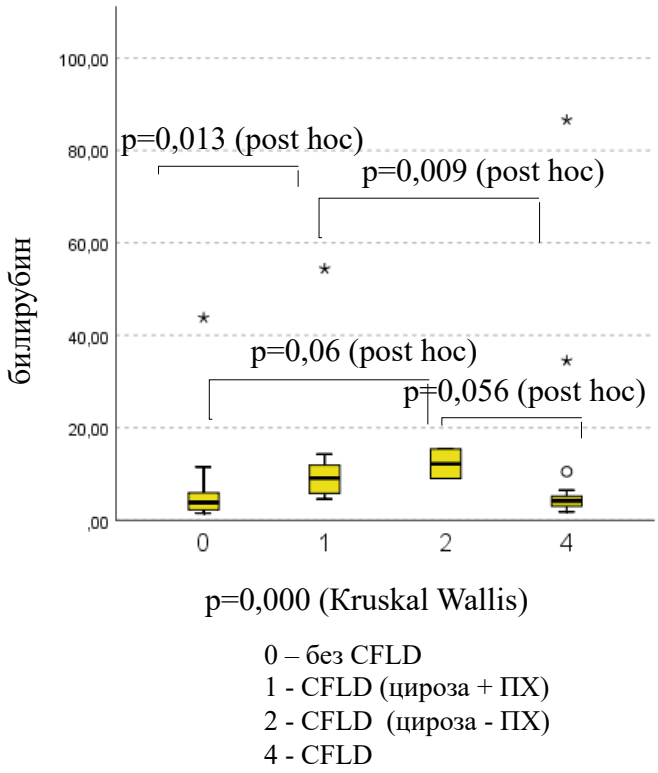
Фигура 72. Стойности на АЛАТ при пациенти с/без CFLD.




p=0,000 (Kruskal Wallis)

0 – без CFLD
1 - CFLD (цироза + ПХ)
2 - CFLD (цироза - ПХ)
4 - CFLD

Фигура 73. Стойности на ГГТ при пациенти с/без CFLD.

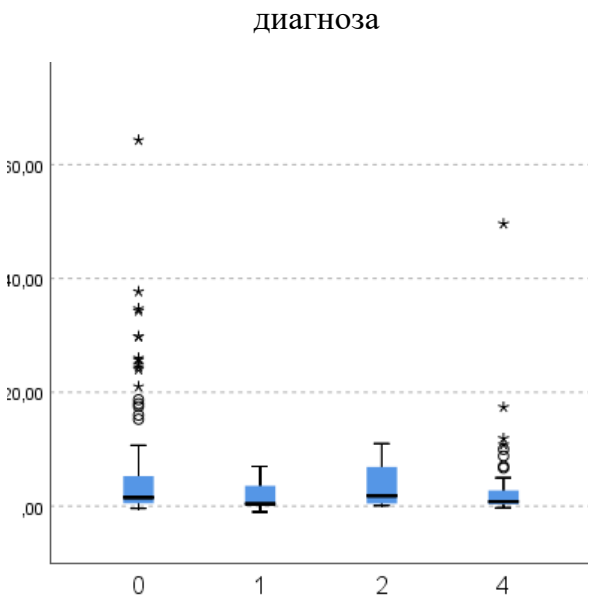



Фигура 74. Стойности на билирубин при пациенти с/без CFLD.

| Група/ Показател | Без CFLD | Цироза с ПХ | Цироза без ПХ | CFLD без цироза | p ( Kruskal Wallis) |
|---|---|---|---|---|---|
| АСАТ (U/l) | 24,09±11,92 | 37,5±9,69 | 41,33±13,31 | 31,54±20,82 | 0,032 |
| АЛАТ (U/l) | 24,24±14,32 | 32,16±16,32 | 27,66±9,29 | 30,41±17,43 | 0,130 |
| ГГТ (U/l) | 14,59±9,94 | 60,0±35,01 | 52,0±44,57 | 26,0±27,31 | 0,000 |
| Билирубин (µmol/L) | 4,27±2,49 | 8,57±4,24 | 15,4±3,29 | 9,41±18,99 | 0,000 |

Таблица 10. Средни стойности за чернодробните показатели според групата, в която попадат пациентите.

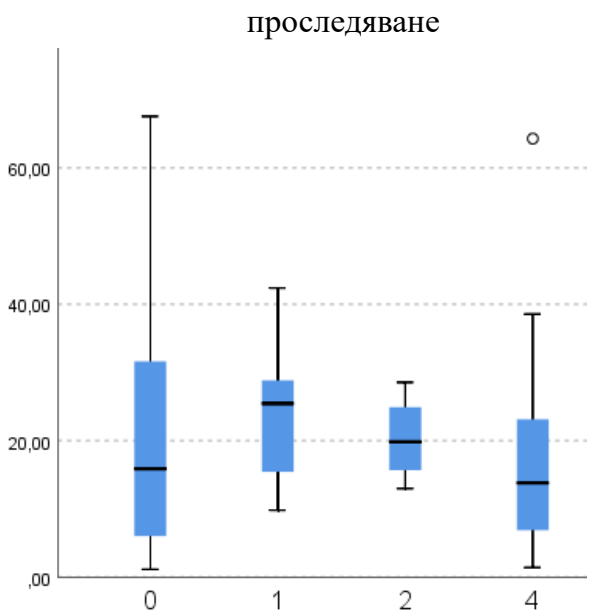
Допълнителен анализ е направен и на пациентите с CFLD и възрастта им на диагностициране, проследяване и смърт, като и в трите категории липсват статистически значими разлики (Фигури 75-77).




p=0,163 (Kruskal Wallis)

0 – без CFLD
1 - CFLD (цироза + ПХ)
2 - CFLD (цироза - ПХ)
4 - CFLD

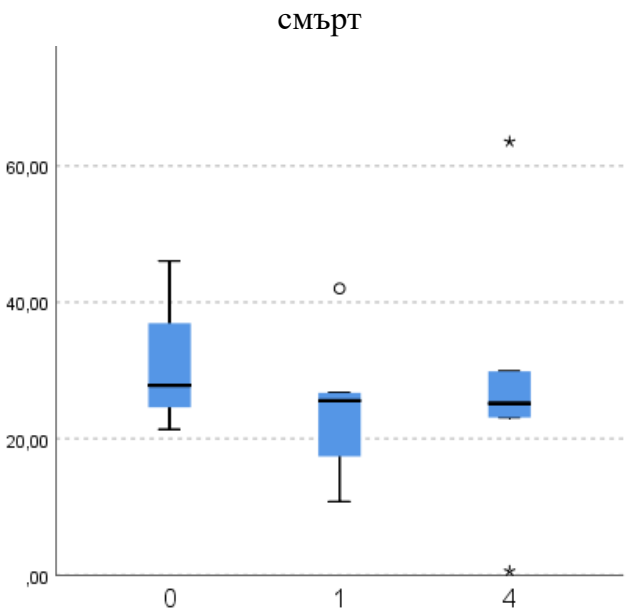
Фигура 75. CFLD и възраст на диагностициране на пациентите.




p=0,098 (Kruskal Wallis)

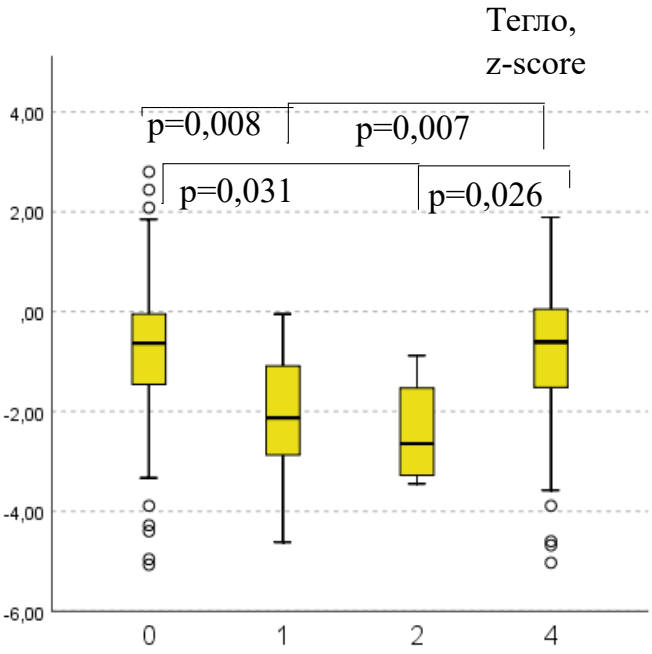
0 – без CFLD
1 - CFLD (цироза + ПХ)
2 - CFLD (цироза - ПХ)
4 - CFLD

Фигура 76. CFLD и възраст на проследяване на пациентите.




Фигура 77. CFLD и възраст на настъпване на смърт при пациентите.

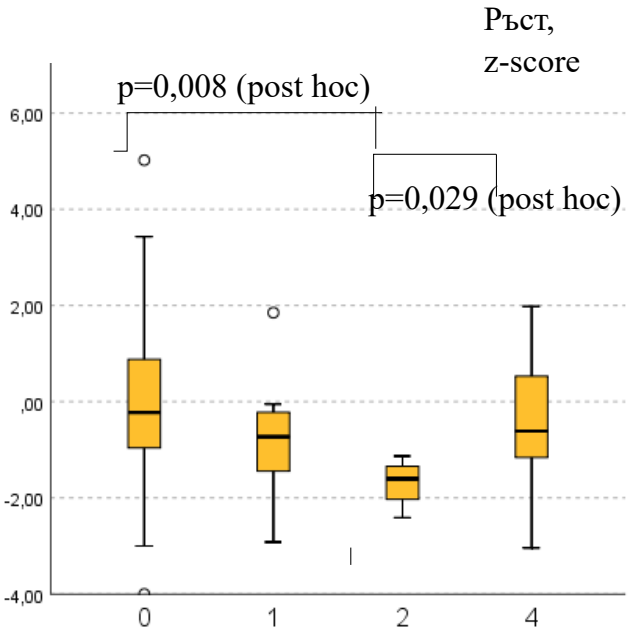
На следващите три фигури са представени антропометричните показатели на пациентите с/без CFLD от проучването. Данните са за z-score (стандартни отклонения за възрастта) за тегло (Фигура 78), ръст (Фигура 79) и ИТМ (Фигура 80) и показват, че пациентите с цироза с/без ПХ са с най-ниско тегло, ръст и с най-лош ИТМ.




p=0,007 (Kruskal Wallis)

0 – без CFLD
1 - CFLD (цироза + ПХ)
2 - CFLD (цироза - ПХ)
4 - CFLD

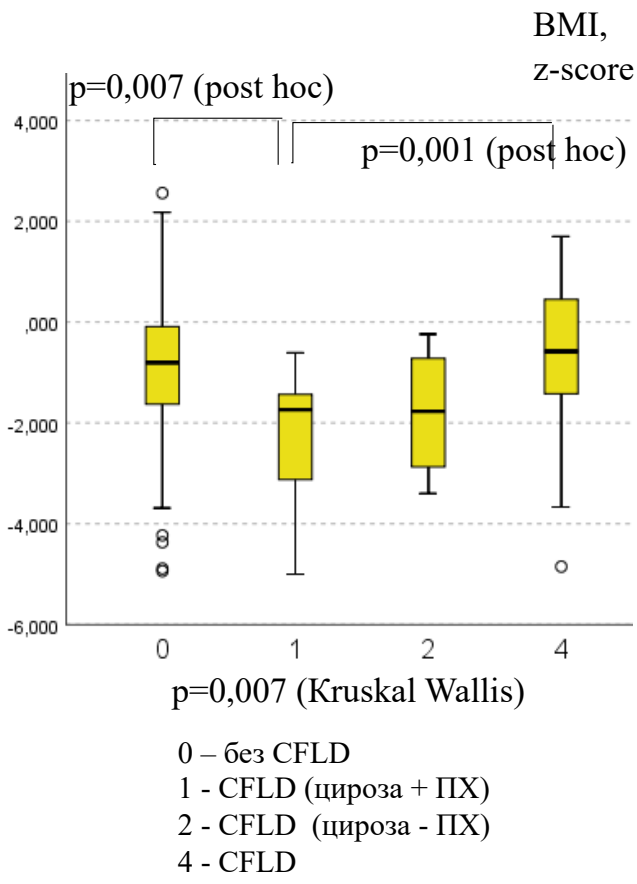
Фигура 78. Антропометрични показатели при CFLD – тегло.




p=0,020 (Kruskal Wallis)

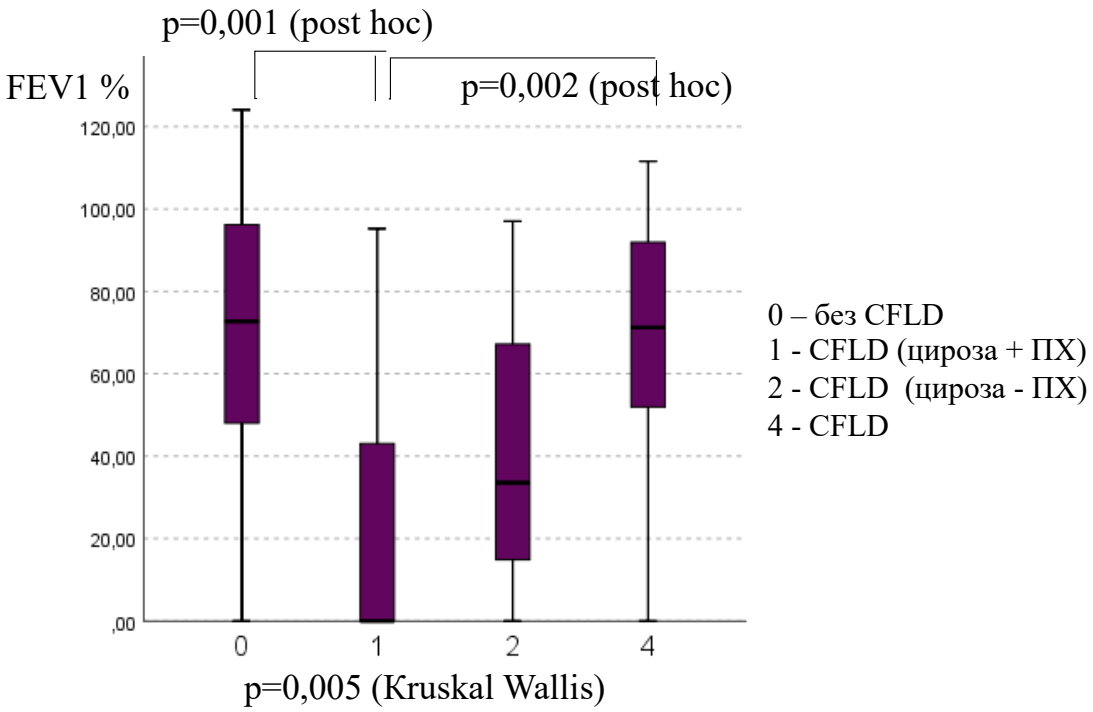
0 – без CFLD
1 - CFLD (цироза + ПХ)
2 - CFLD (цироза - ПХ)
4 - CFLD

Фигура 79. Антропометрични показатели при CFLD – ръст.



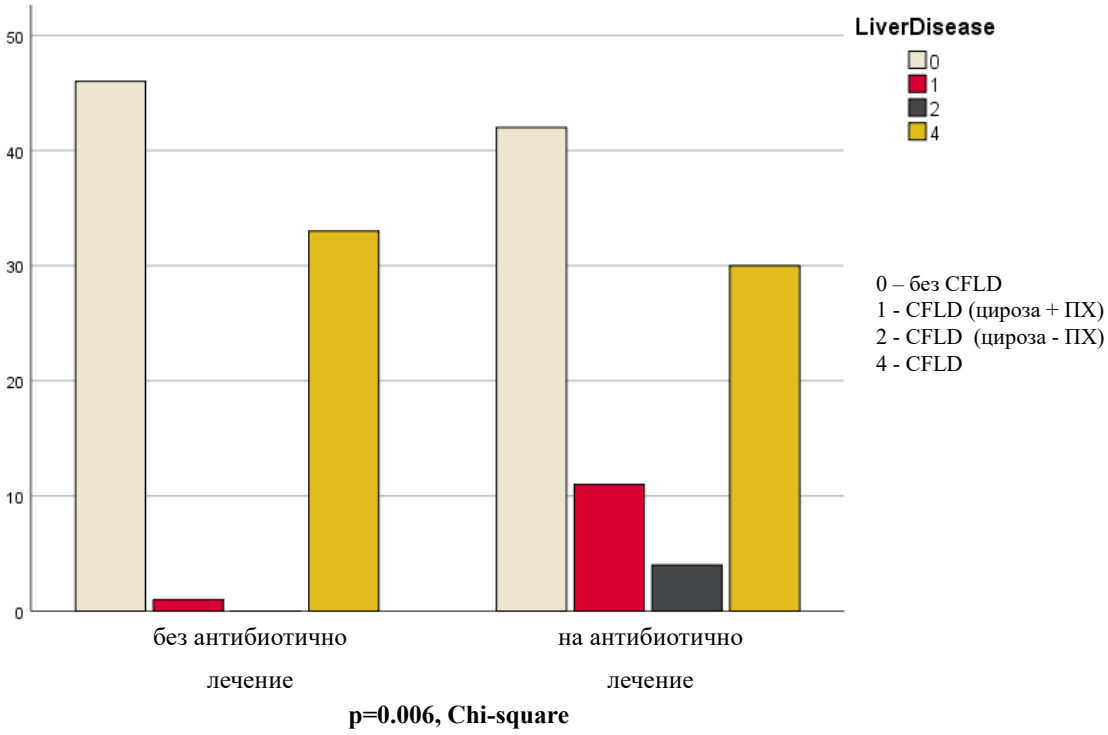

Фигура 80. Антропометрични показатели при CFLD – ИТМ.

На следващата фигура е представена белодробната функция като FEV1 при пациенти с/без CFLD. Видни са по-лошите показатели при наличие на CFLD, определени по два корелационни метода (Фигура 81). Може да се направи извода, че CFLD може да служи като прогностичен белег за по-бърза прогресия на МВ.



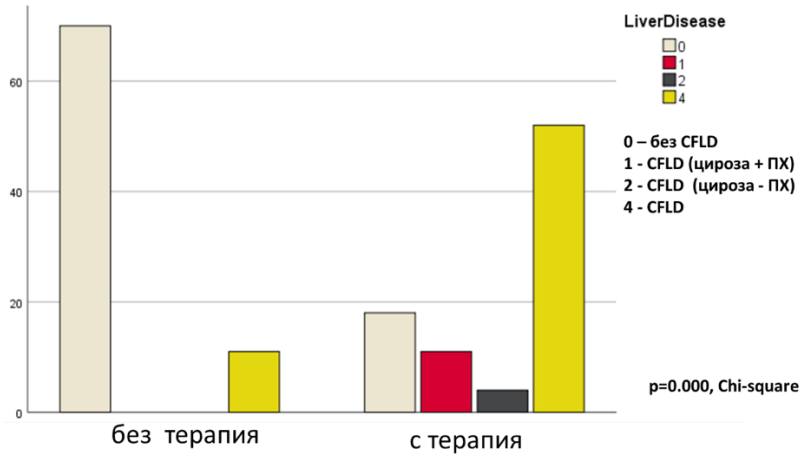

Фигура 81. FEV1 при пациенти с/без CFLD.

На следващата фигура е представена зависимост на CFLD и приема на антибиотици (Фигура 82). Видно е, че пациентите на антибиотична терапия са по-често с CFLD.



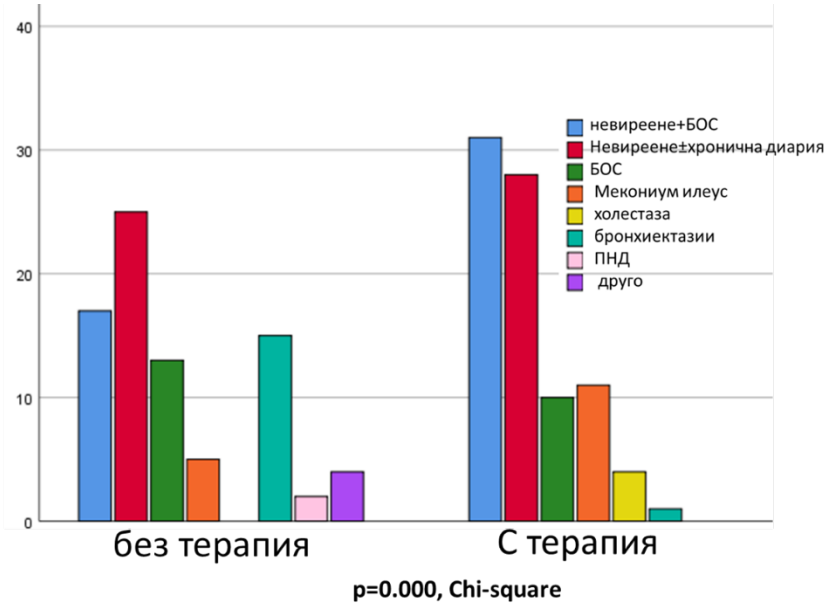

Фигура 82. Прием на антибиотици при пациентите с/без CFLD.

Налице и зависимост между приложението на урсодеоксихолева киселина и CFLD (фигура 83). Всички пациенти с цироза са на терапия, но има пациенти, които са с CFLD без цироза и не получават холеретик.




Фигура 83. Прием на урсодеоксихолева киселина при пациенти с/без CFLD.

Значими различия се установяват в приложението на урсодеоксихолева киселина и повода за диагноза на заболяването. Очаквано всички пациенти с холестаза са на терапия, за разлика от пациентите с пренатално поставена диагноза МВ (фигура 84).




Фигура 84. Прием на урсодеоксихолева киселина при пациентите, според повода за диагностициране.

## 5.2. ПРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ

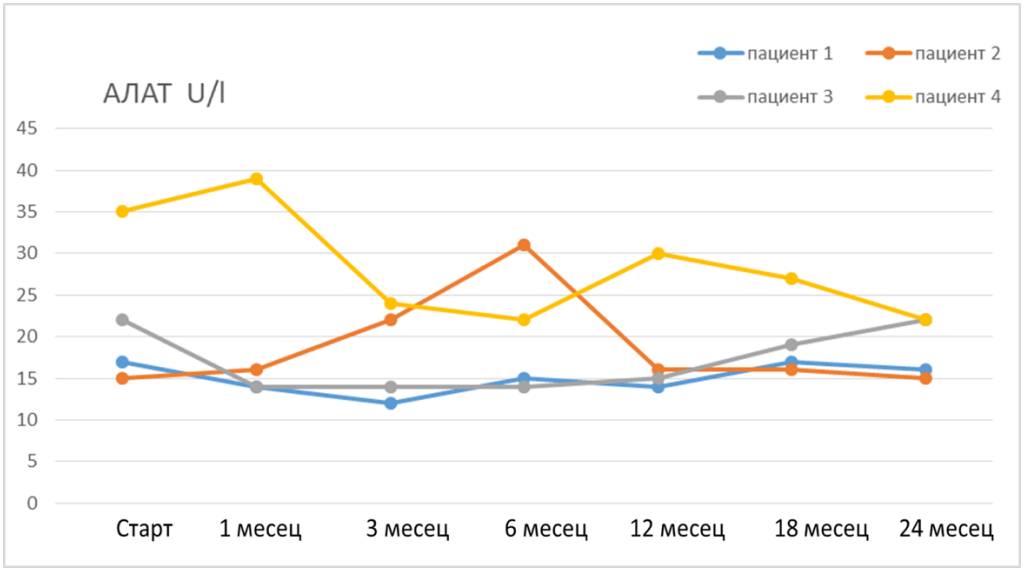
В проспективното проучване са включени 82 пациента на терапия с CFTRm. При проследяване на чернодробните показатели (лабораторни и ехографски) при три деца се отбеляза бързопреходно повишение на трансаминазите, без ехографско влошаване. При нито един пациент не се наложи прекратяване или коригиране на терапията след започването ѝ, поради нежелани явления от страна на черния дроб. При три от децата с по-дълготрайна терапия (над две години) се наблюдава почти нормален ехографски образ след първоначални промени по типа CFLD без цироза преди началото на лечението. Почти всички деца са с нормални стойности на трансаминазите на 12-ти месец от лечението с различни по-степен ехографски промени. Не се отчита влошаване спрямо изходните образи. На графиката е представено разпределението във времето на пациентите по медикаменти (Фигура 85).



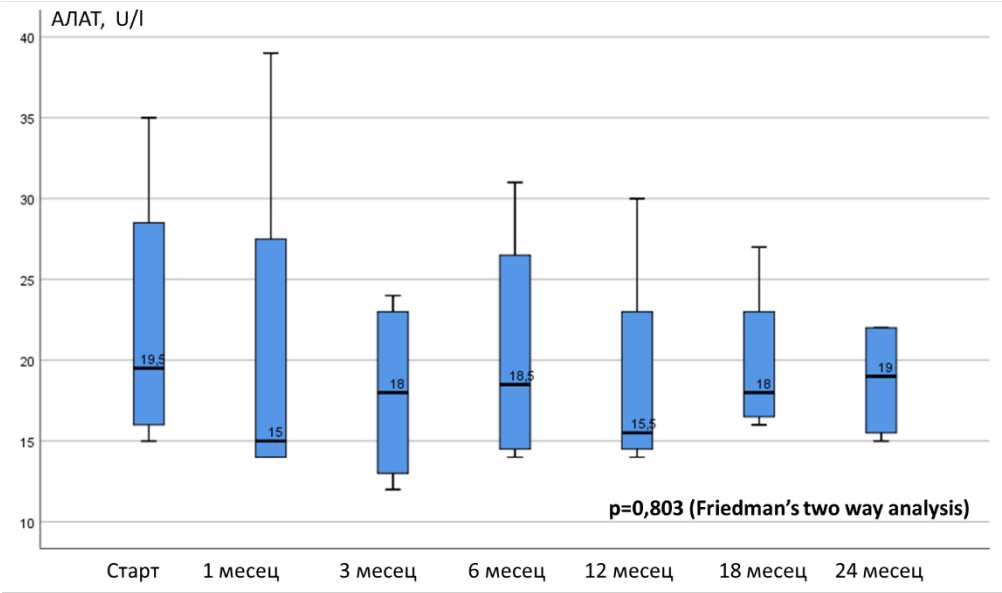

Фигура 85. Дизайн на проучването включващо 82 пациента на CFTRm терапия според момента на започване на лечението.

Поради разликите в медикаментите, които се използват и ефекта им върху черния дроб, анализирахме данните в три отделни групи спрямо проведената терапия – деца на монотерапия с ивакафтор (4 пациента), които са и с най-дълготрайното проследяване; група на двойна терапия ивакафтор/лумакафтор (23 пациента) и най-голямата група на тройна терапия ивакафтор/тезакафтор/елексакафтор (55 пациента). В третата група особено внимание се отдели на 7 пациента с напреднало чернодробно увреждане – чернодробна цироза клас В по Child-Pugh. Резултатите на тези деца са сравнени с данните на другите пациенти на тройна терапия.

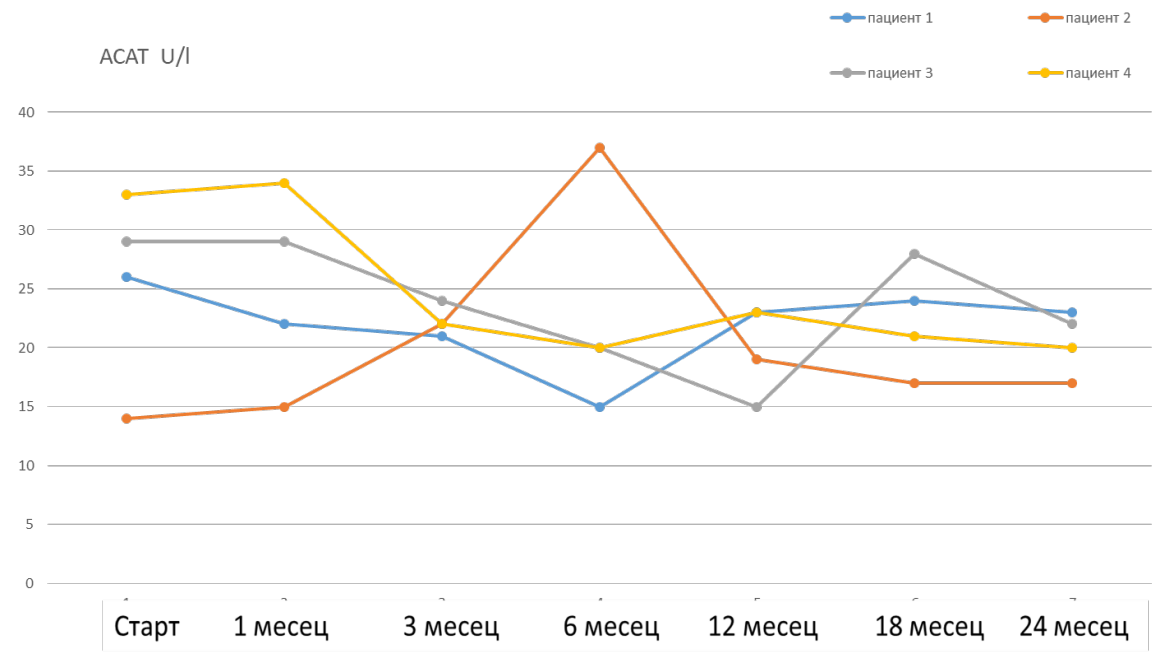
На следващите шест фигури са представени данните от чернодробните показатели при пациентите на монотерапия (Фигури 86-91). За всеки един ензим резултатите са представени като крива с индивидуалните резултати на отделните пациенти и като бокс-плот графики с усреднена стойност. Направен е анализ на Friedman two-way, който не установи статистически значима разлика в показателите и различните времеви интервали за АЛАТ, АСАТ и ГГТ (съответно p=0,803; p=0,763; p=0,626).



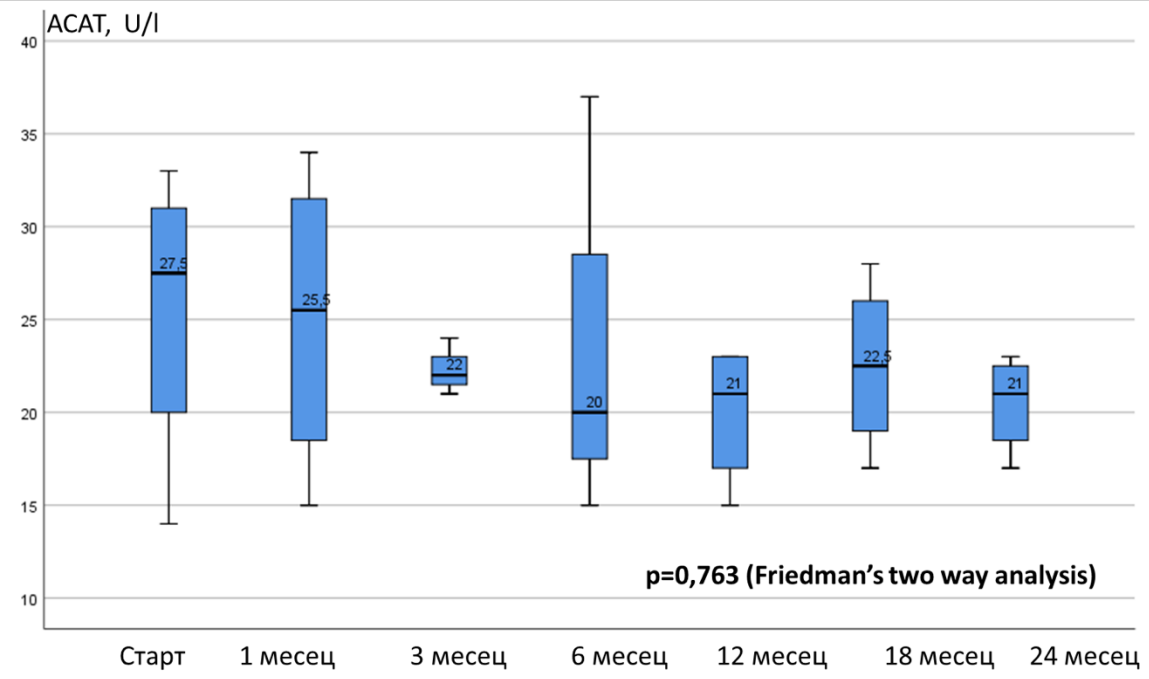

Фигура 86. Стойности на АЛАТ U/l при проследяване на пациентите за първите две години от лечението.



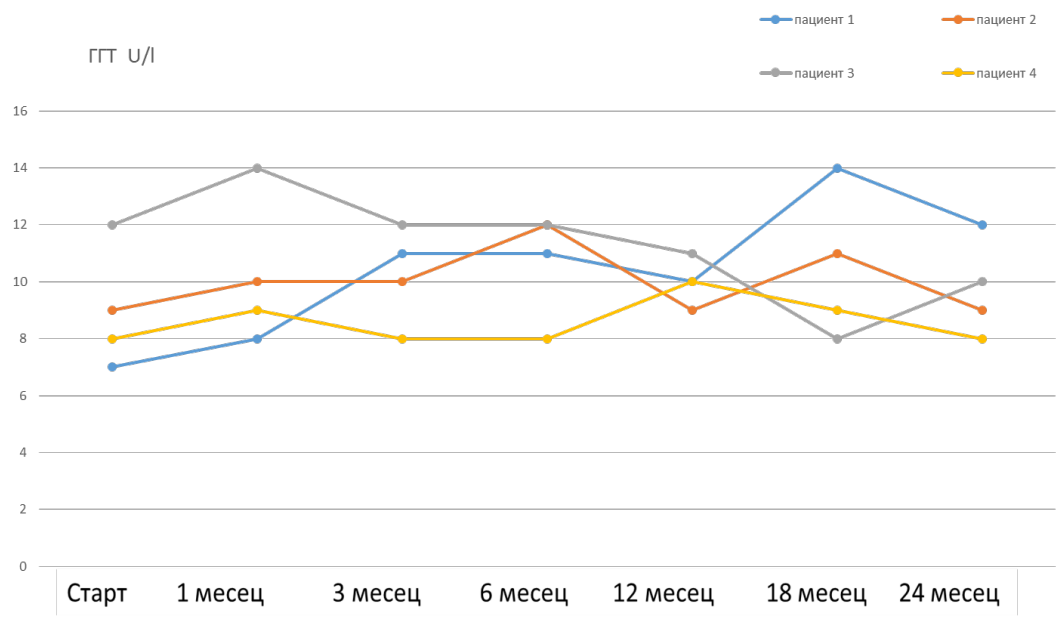

Фигура 87. Box-plot графика с разпределението на стойностите на АЛАТ (U/l) съобразно момента на изследване спрямо продължителността на терапията с ивакафтор.



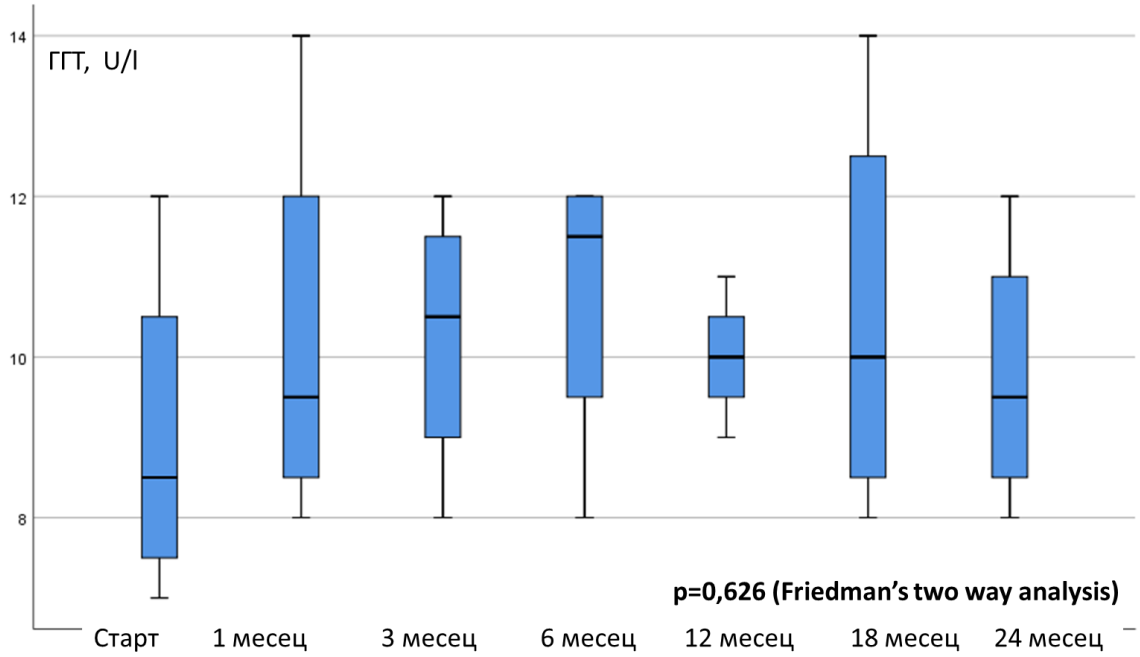

Фигура 88. Стойности на АСАТ U/l при проследяване на пациентите за първите две години от лечението.




Фигура 89. Box-plot графика с разпределението на стойностите на ACAT (U/l) съобразно момента на изследване спрямо продължителността на терапията с ивакафтор.




Фигура 90. Стойности на ГГТ U/l при проследяване на пациентите за първите две години от лечението.

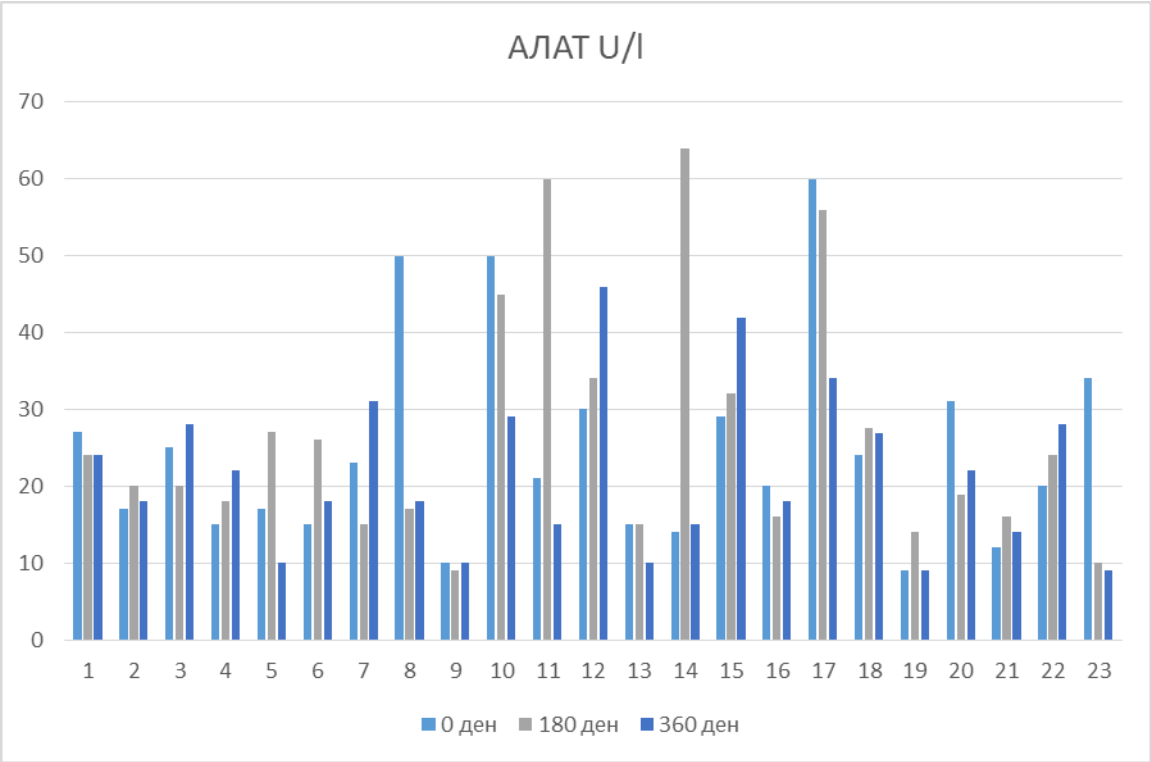



Фигура 91. Box-plot графика с разпределението на стойностите на ГГТ (U/l) съобразно момента на изследване спрямо продължителността на терапията с ивакафтор.

По отношение на ехографските образи не се наблюдава прогресия на чернодробните промени – хетерогенност на паренхима, огнищни промени и размери на черния дроб. Дори при сравнение между изходни образи при определени пациенти, се наблюдава почти възстановен паренхим. Във връзка с горепосоченото, става ясно, че монотерапията с CFTRm не оказва съществено негативно влияние върху чернодробната функция и структура. Даже би могло да се заключи, че цялостното подобрение при пациентите от терапията (подобрен нутритивен и белодробен статус) е свързано и с подобрение на черния дроб и постепенно възстановяване.

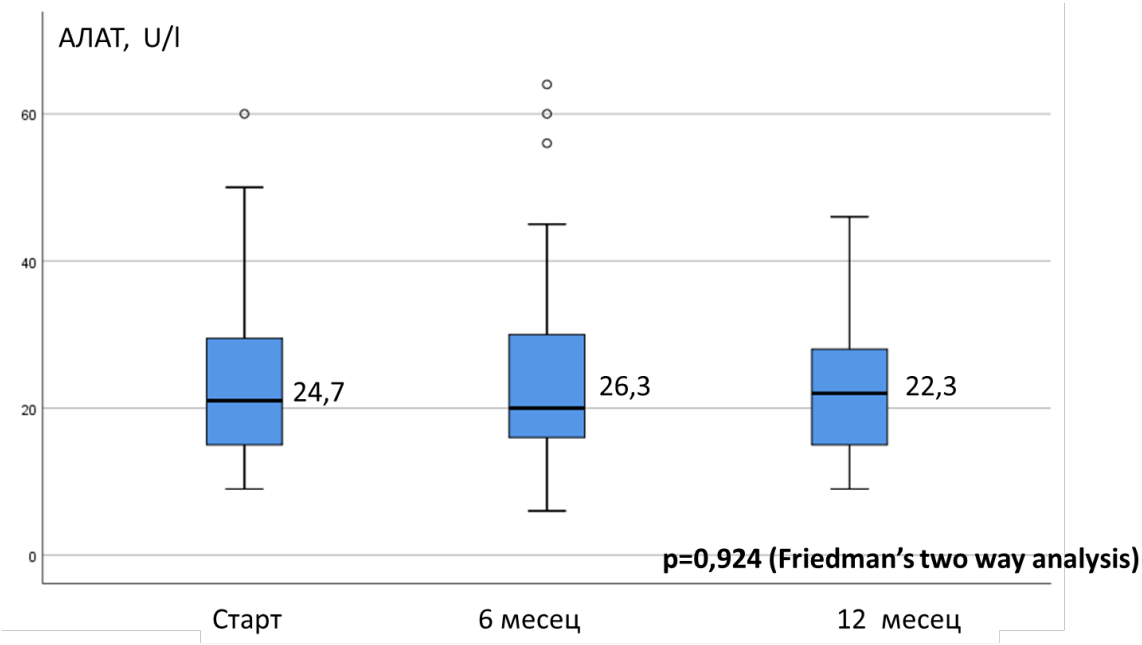
На следващите 6 графики са показани данните на 23 пациента на двойна терапия (лумакафтор/ивакафтор) в три времеви момента от лечението – в началото, на 6-ти месец и на първата година от стартиране на лечението (Фигури 92-97). Статистически значими разлики се открояват по отношение на ГГТ и тенденция при АСАТ, но няма такива

за АЛАТ, като е проведен анализ на Friedman two-way p=0,924; p=0,013; p=0,052 съответно за АЛАТ, АСАТ и ГГТ.



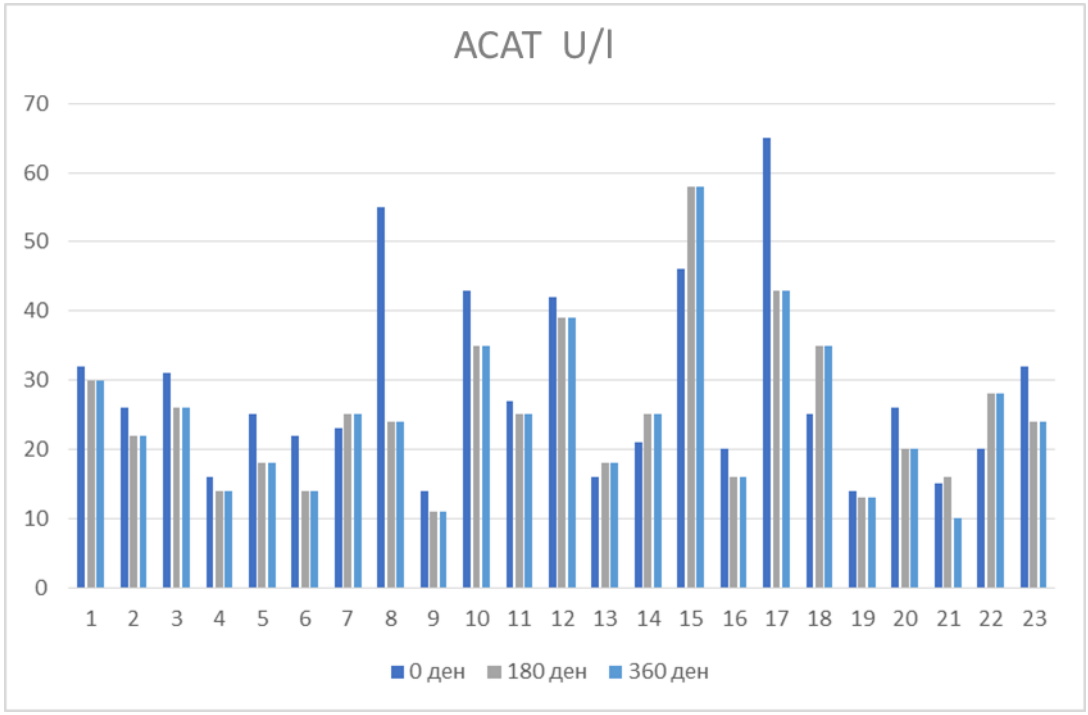

Фигура 92. Стойности на АЛАТ U/l при проследяване на пациентите за първата година от терапията.

При пациенти 11, 14 и 18 се наблюдава временно повишение на стойността на 6-ти месец, които се нормализират до края на първата година. С тенденция за покачване в показателите, но задържането им в нормални стойности, са пациенти 3, 4, 7, 18 и 21. Пациент 12 при оценката си на първата година бе с позитивни IgM EBV, на 18-ия месец трансаминазите са в границите на изходните стойности преди терапията. Подобна тенденция се наблюдава и при пациент 15, но при него се е наложило в края на първата година антибиотично лечение за стрептококова ангина и не е установен вирусен причинител. Не се е налагало спиране на лечението.

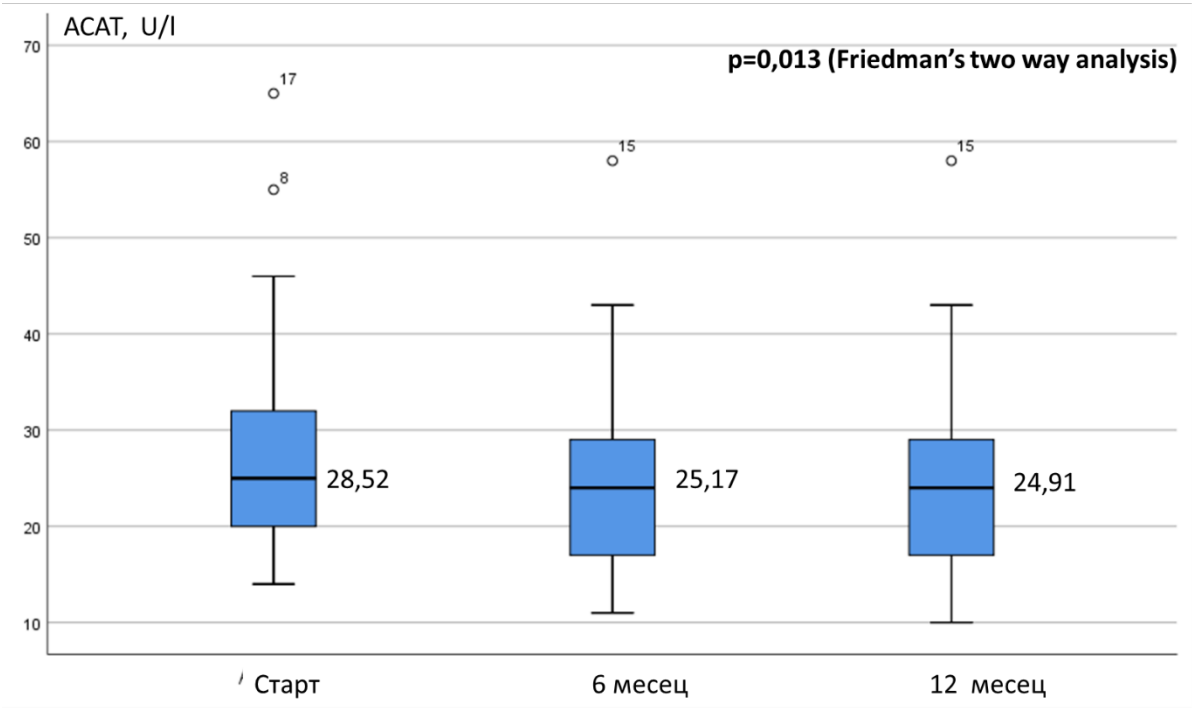



Фигура 93. Box-plot графика с разпределението на стойностите на АЛАТ (U/l) съобразно момента на изследване.

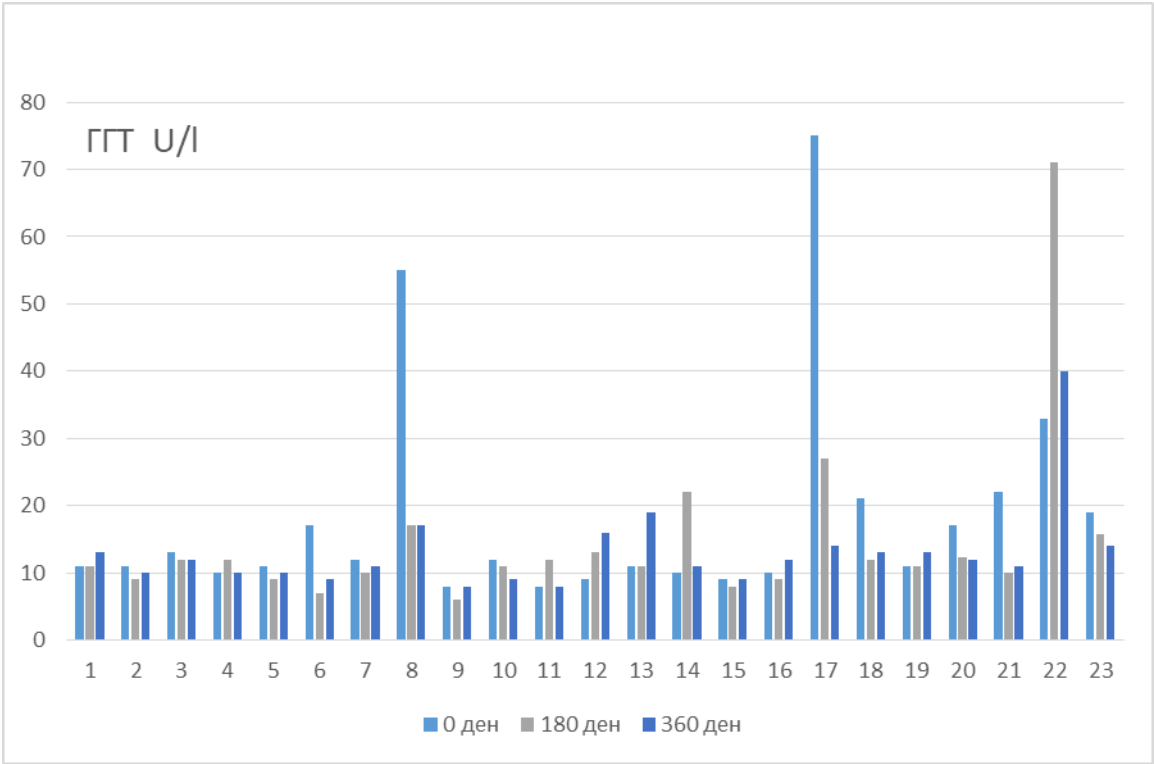
Чувствително повишени стойности на АСАТ са наблюдавани само при пациенти 15, 18 и 22, докато при всички други пациенти се наблюдава спад при последващите изследвания, което насочва към тенденция за спад и при средните стойности.




Фигура 94. Стойности на АСАТ U/l при проследяване на пациентите за първата година от терапията.

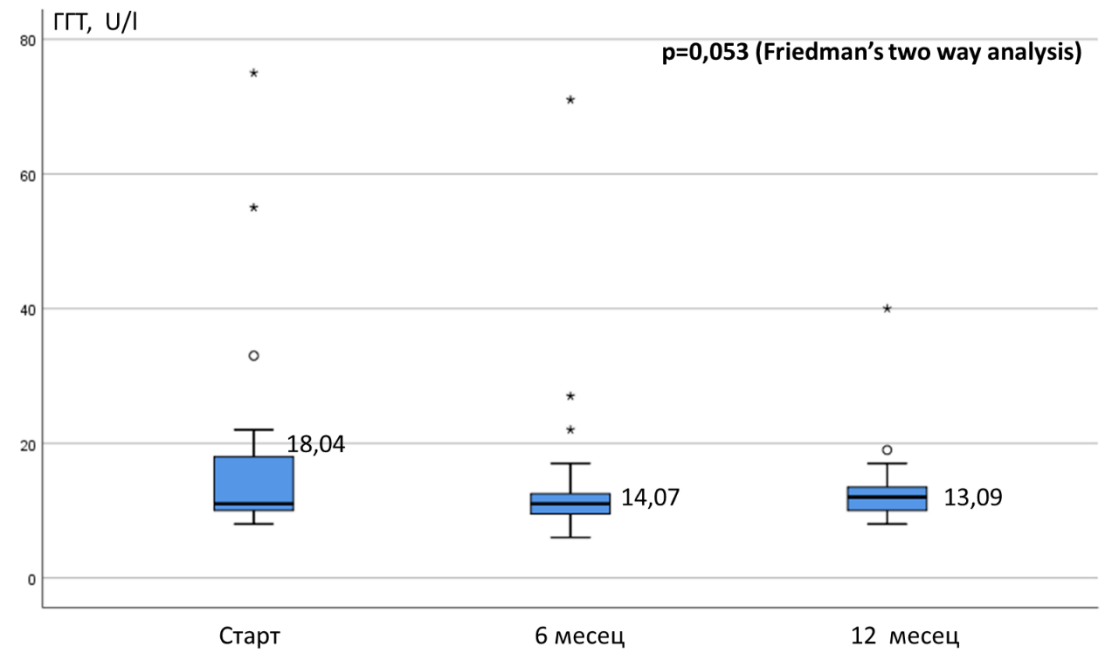



Фигура 95. Box-plot графика с разпределението на стойностите на ACAT (U/l) съобразно момента на изследване.




Фигура 96. Стойности на ГГТU/l при проследяване на пациентите за първата година от терапията.

Стойностите на ГГТ са с най-малка динамика при повечето пациенти, а тези с по-високи изходни стойности показват тенденция за нормализирането и задържането им в референтни граници. Само при двама пациенти 14 и 22 се наблюдава краткотрайно повишение на 6-ти месец с нормализиране на стойността на 12-ти. Общата тенденция е към намаляване на стойностите на ГГТ.

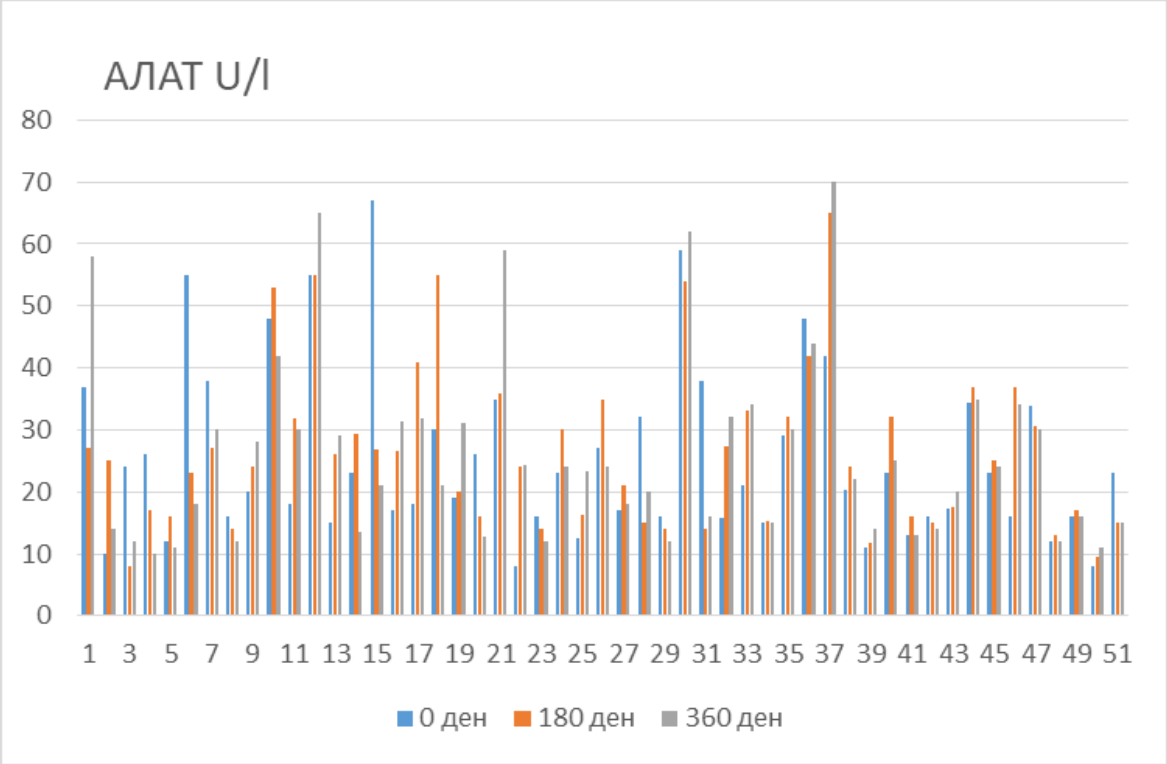



Фигура 97. Box-plot графика с разпределението на стойностите на ГГТ (U/l) съобразно момента на изследване.

Двойната терапия подобно на монотерапията не оказва съществено негативно влияние върху чернодробната функция и структура.

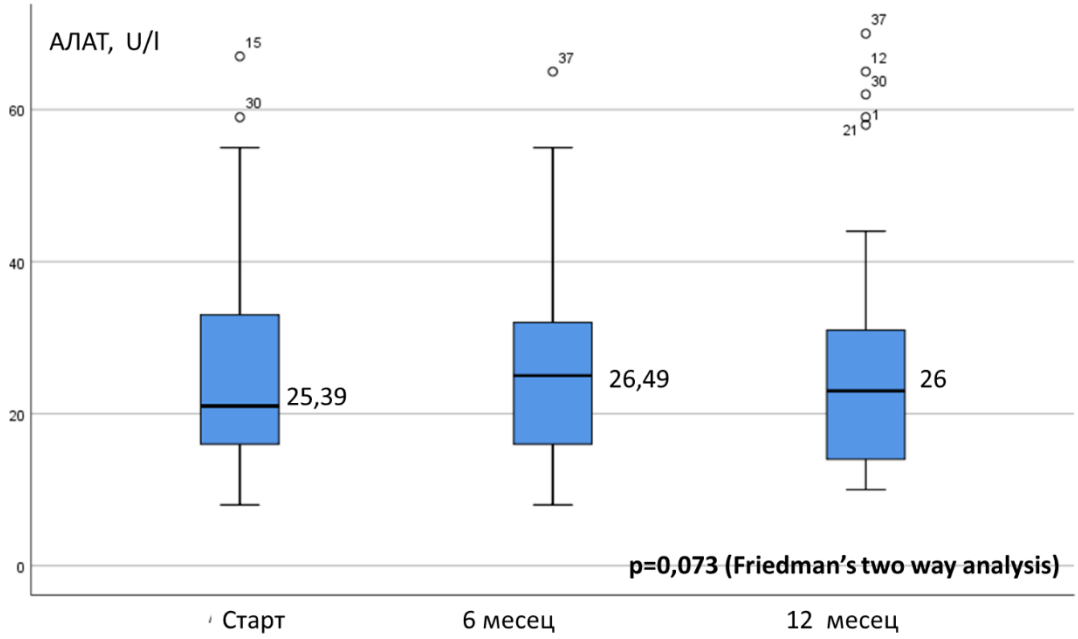
След одобрение и включване на тройната терапия (елексакафтор/ тезакафтор/ивакафтор) в режим на реимбурсация, за период от 5 месеца 51 пациента започват лечение. Заедно с четиримата включени преди това данните им са анализирани обобщено, подобно на другите две терапии и разделени на две групи според тежестта на засягане на черния дроб. В анализа на общата група не се установи статистически значима разлика в

показателите и различните времеви интервали за АЛАТ, АСАТ и ГГТ (съответно p=0,073; p=0,099; p=0,246 Friedman two-way) (Фигури 98-103).

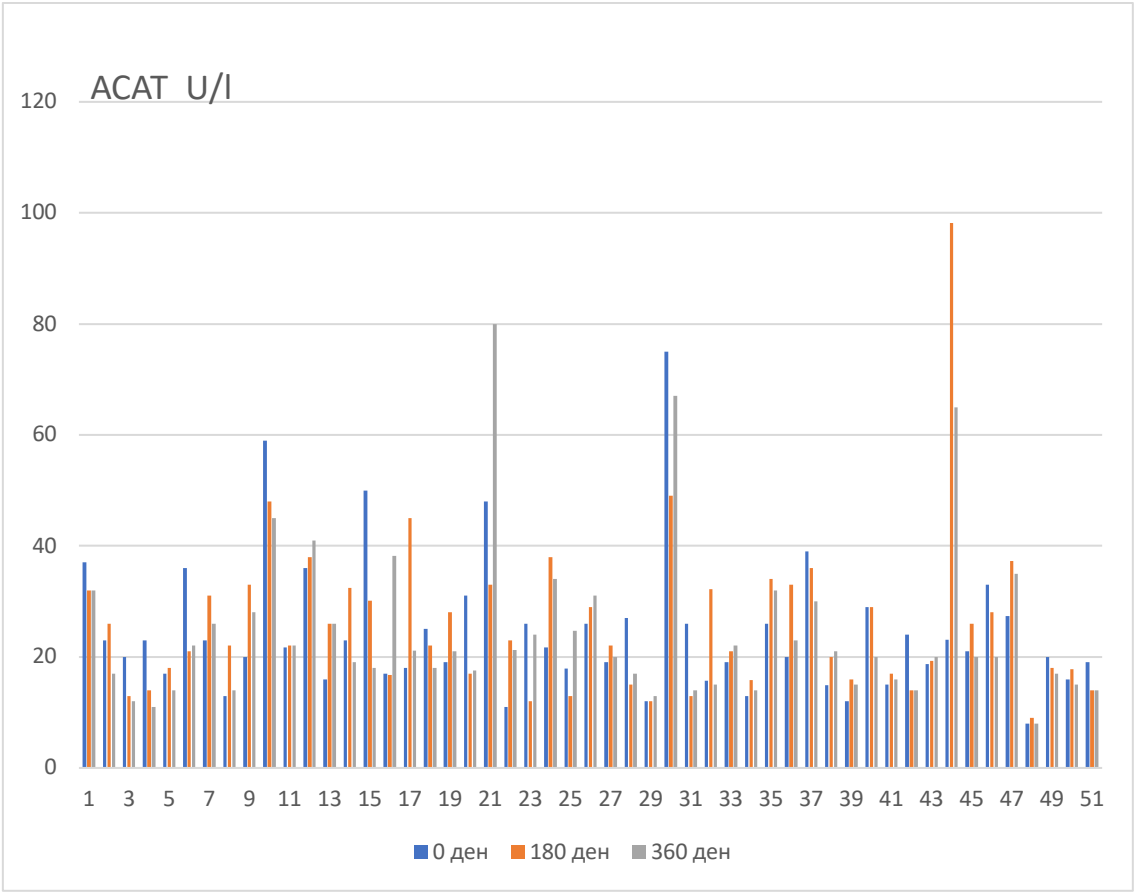



Фигура 98. Стойности на АЛАТ U/l при проследяване на пациентите за първата година от терапията.

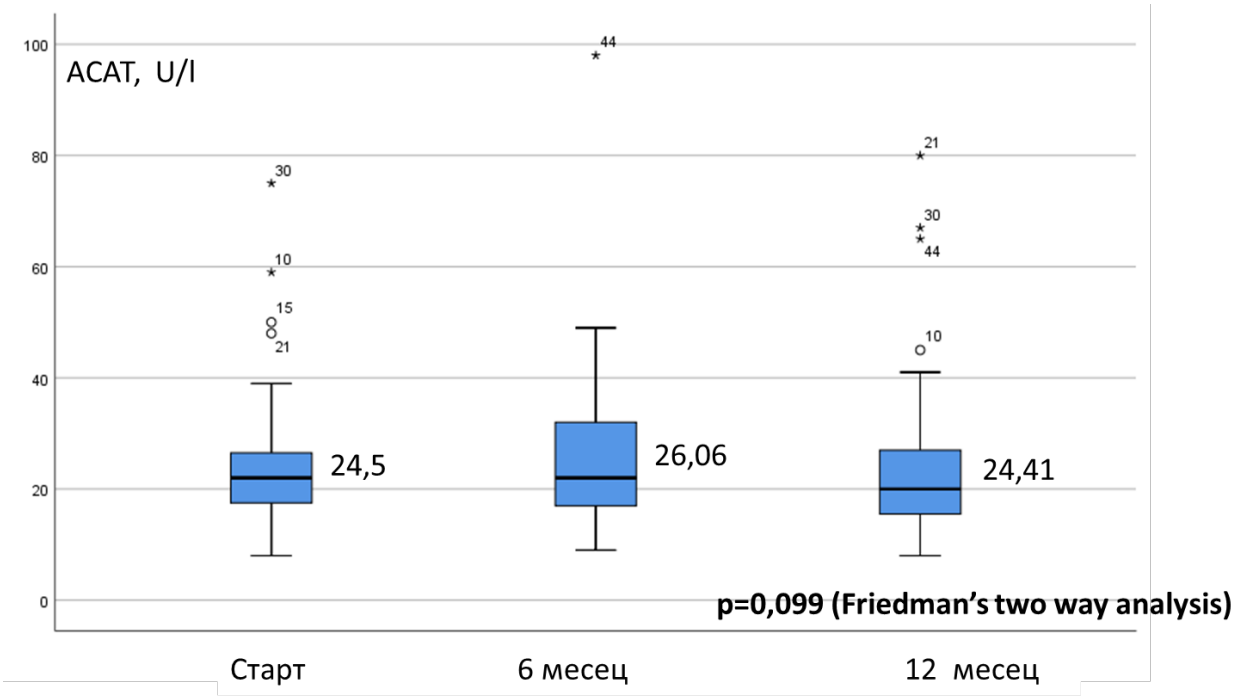
Стойностите на АЛАТ са средно около 26 U/L и за трите времеви периода на изследване, като само при 5 пациента се наблюдаваше чувствително повишение след началото на лечението. Трябва да се отбележи, че тези пациенти не са с напреднало чернодробно засягане. При нито един от пациентите не се е наложило спиране на лечението.



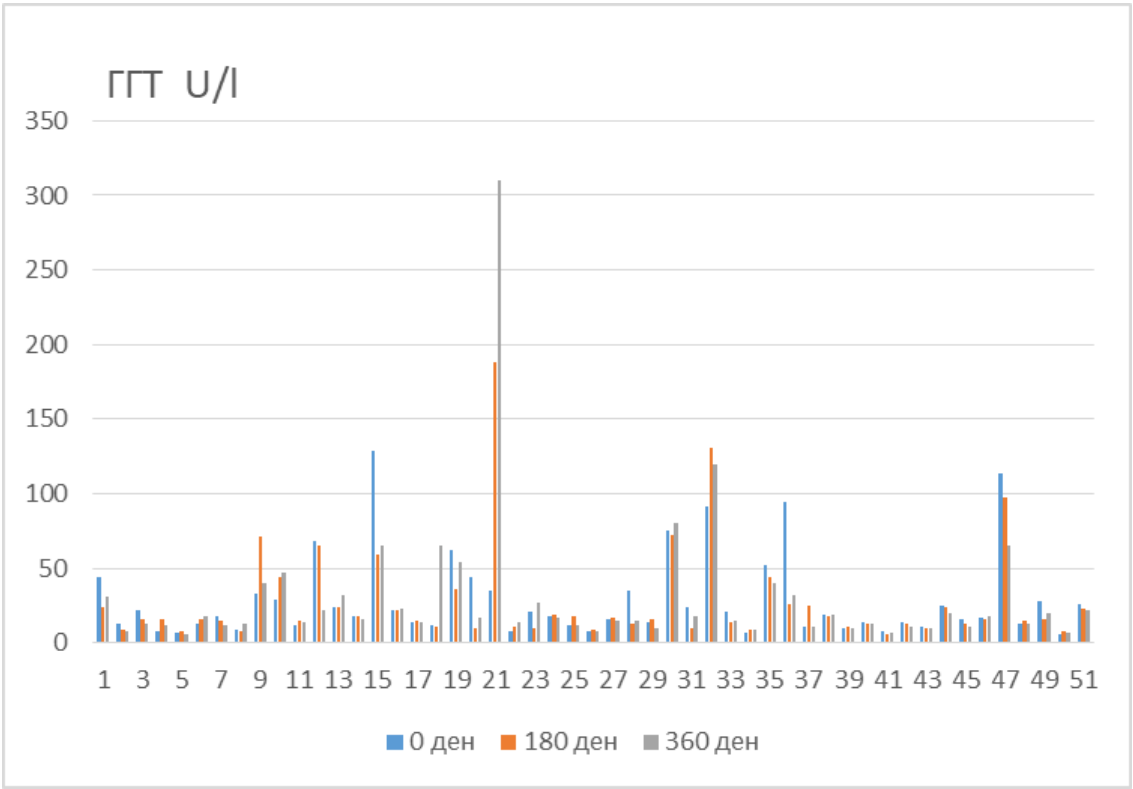

Фигура 99. Box-plot графика с разпределението на стойностите на АЛАТ (U/l) съобразно момента на изследване.



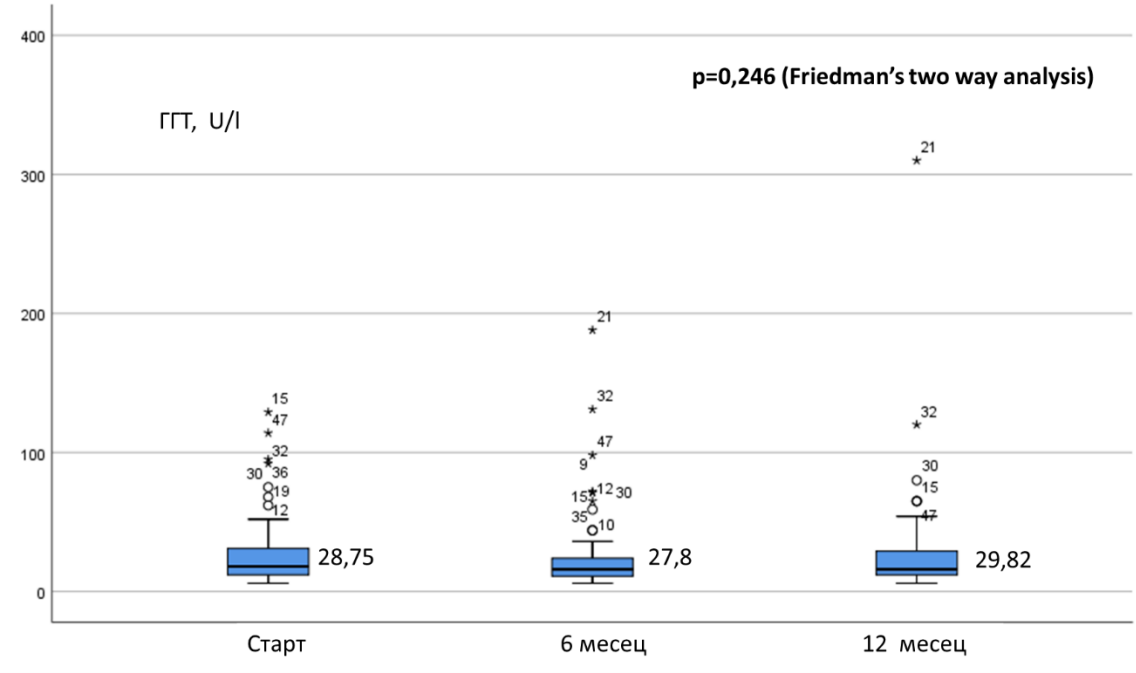

Фигура 100. Стойности на ACAT U/l при проследяване на пациентите за първата година от терапията.




Фигура 101. Box-plot графика с разпределението на стойностите на ACAT (U/l) съобразно момента на изследване.

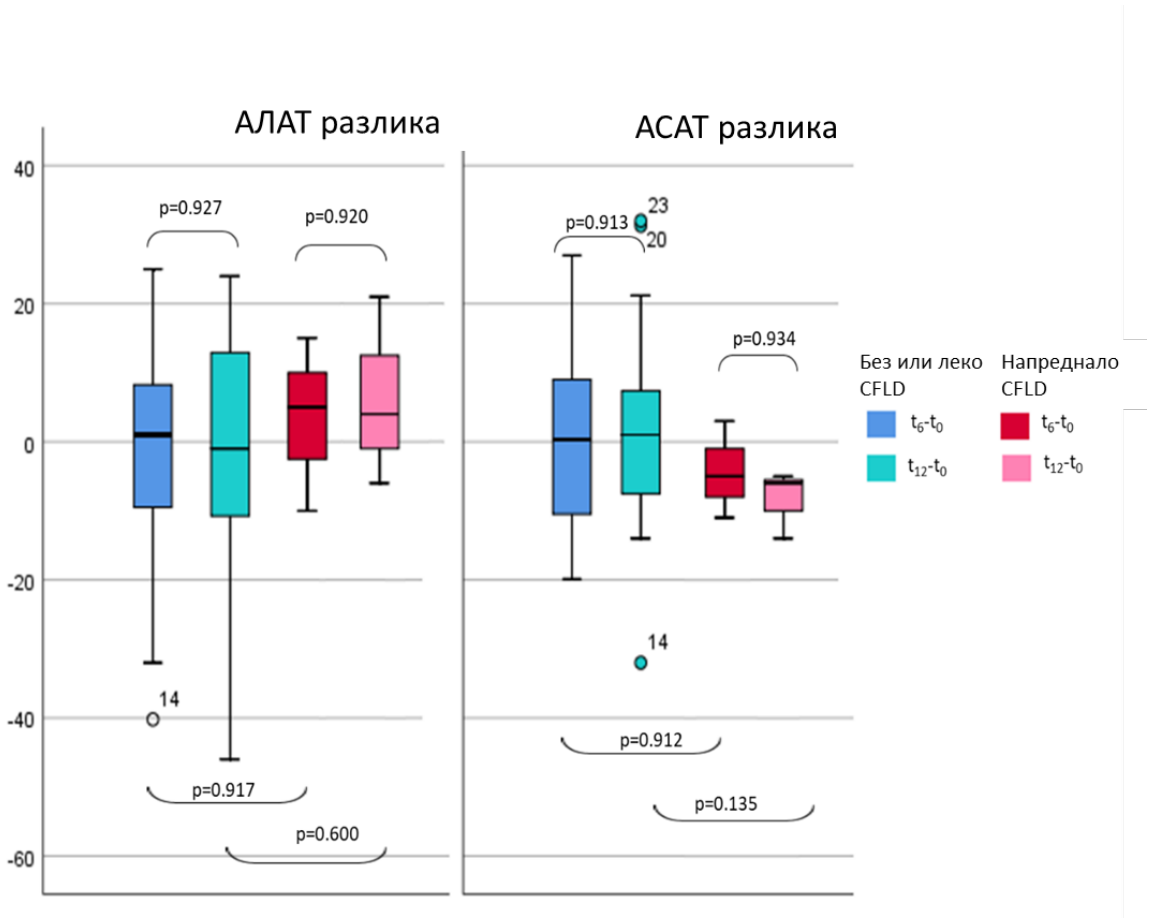



Фигура 102. Стойности на ГГТ U/l при проследяване на пациентите за първата година от терапията.



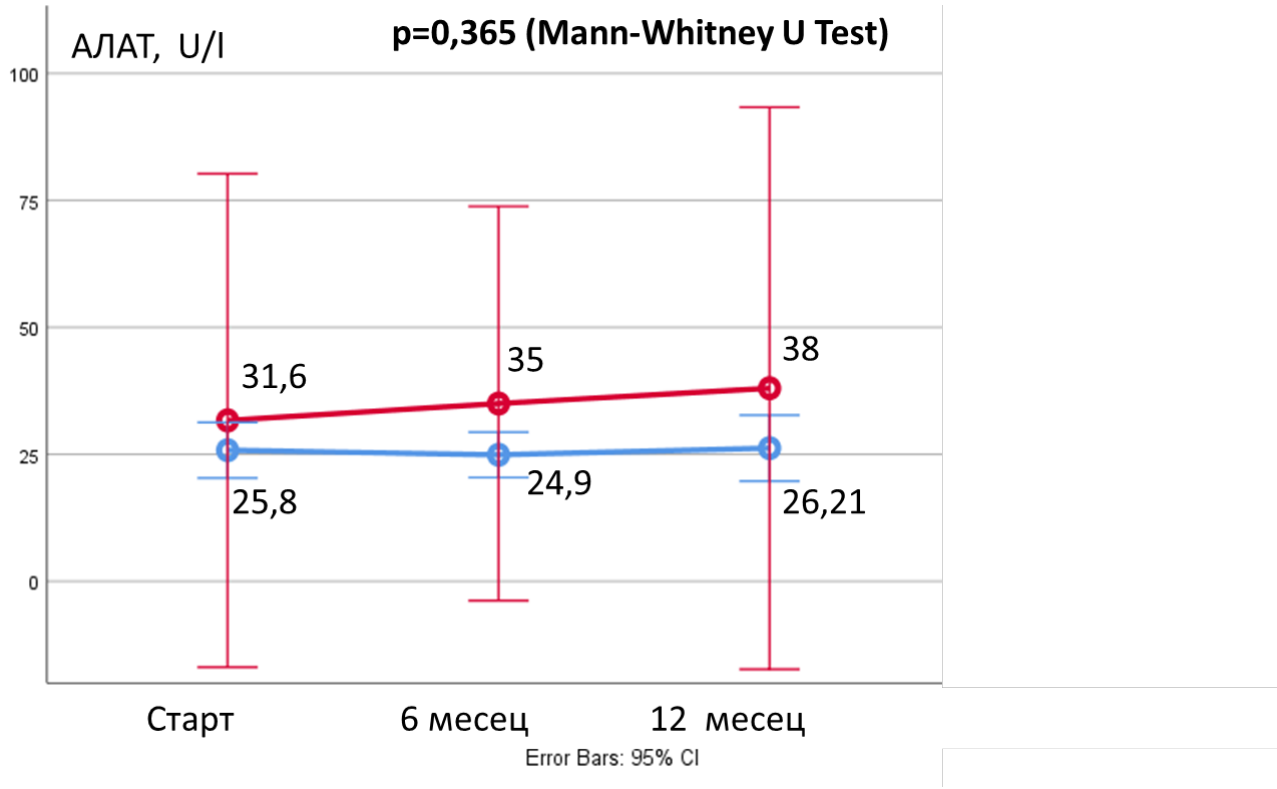

Фигура 103. Box-plot графика с разпределението на стойностите на ГГТ (U/l) съобразно момента на изследване.

В групата пациенти на тройна терапия 7 са с тежко чернодробно засягане – цироза клас В по Child-Pugh. Включването на тройната терапия при тези пациенти бе прецизирано от екип детски пулмолог и детски гастроетеролог, и съобразно белодробното засягане се започна пълна доза при 4 от децата или редуцирана според кратката характеристика на продукта (КХП) – при 3 пациента. Децата с по-тежко белодробно засягане са на пълна доза и са мониторирани ежеседмично от детски гастроентеролог през първите три месеца. Анализира се промяната в чернодробните показатели на тези пациенти спрямо пациентите без тежко чернодробно засягане. Стойностите на показателите очаквано са по-високи при пациентите с напреднало чернодробно засягане, но тази разлика не достига статистическа значимост. Не се установиха статистически значими разлики в двете групи (фигура 104 -ANOVA, post-hoc).

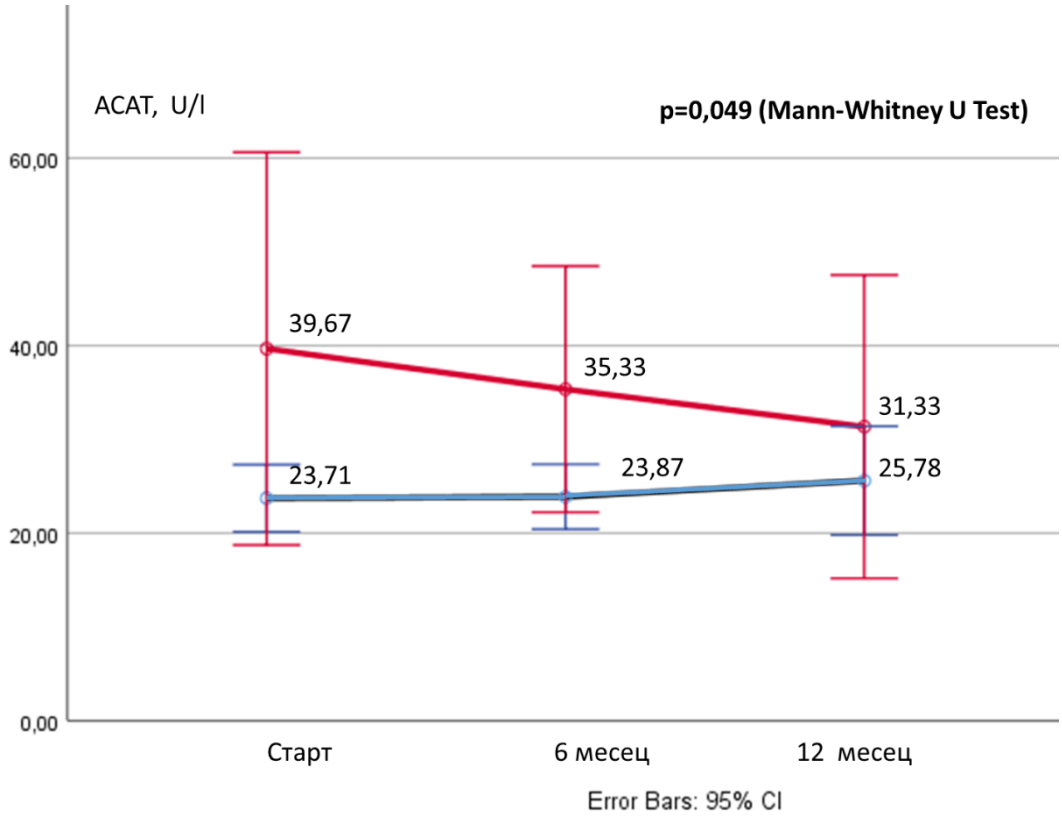



Фигура 104. Box-plot графика с разликите в АЛАТ и АСАТ на 6-ти ($t_6$)и на 12-ти ($t_{12}$) месец спрямо изходната стойност ($t_0$) при децата без тежко (синьо-зелено) и тези с тежко чернодробно засягане (червено, розово).

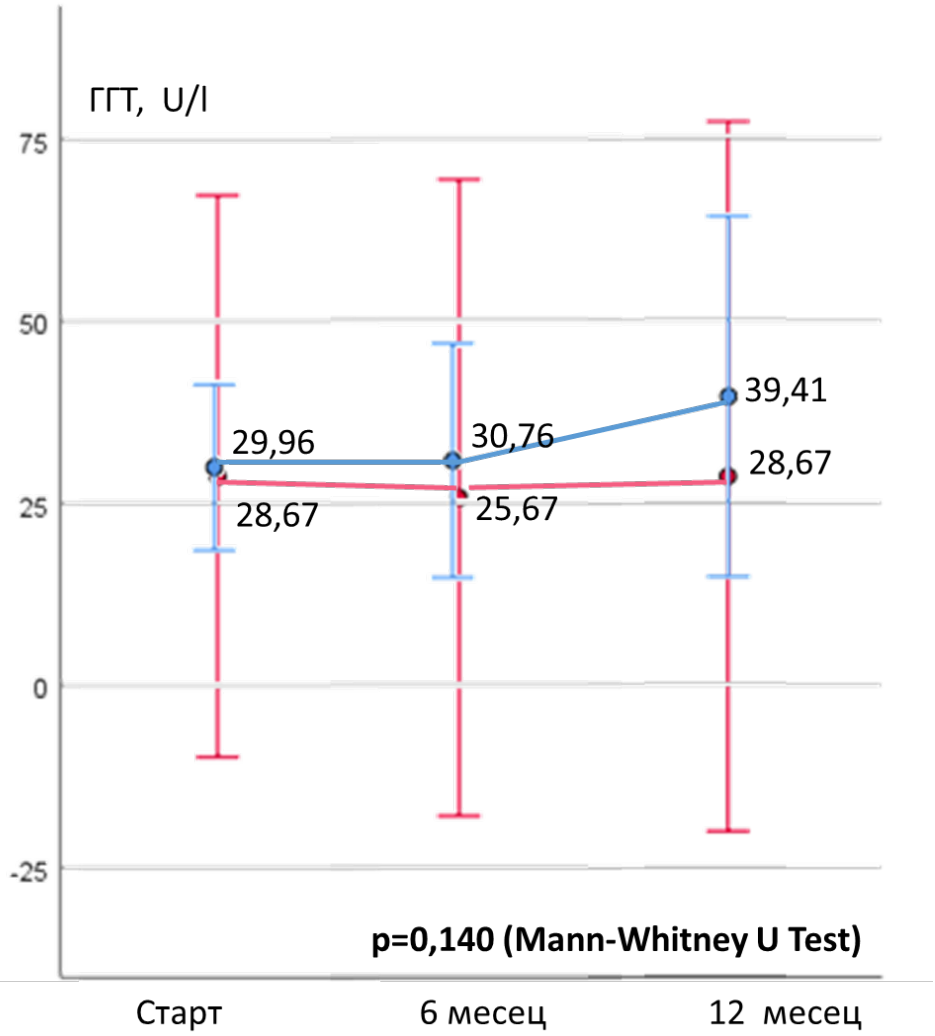
По отношение динамиката в показателите няма статистическа разлика при средните стойности на АЛАТ (p=0,365, Mann-Whitney U test) (фигура 105) и ГГТ (p=0,140, Mann- Whitney U test) (фигура 106), но има такава за АСАТ (p=0,049, Mann-Whitney U test) (фигура 107). Пациентите с тежко чернодробно засягане показват тенденция за по-голям спад в сравнение с другата група. Вероятно поради възстановяването на функцията на CFTR и респективно регенеративните възможности на черния дроб.




Фигура 105. Средни стойности и диапазон на данните за АЛАТ в динамика при пациентите без тежко (синьо) и тези с тежко чернодробно засягане (червено).




Фигура 106. Средни стойности и диапазон на данните за АСАТ в динамика при пациентите без тежко (синьо) и тези с тежко чернодробно засягане (червено).




Фигура 107. Средни стойности и диапазон на данните за ГГТ в динамика при пациентите без тежко (синьо) и тези с тежко чернодробно засягане (червено).

Въпреки първоначално очакваните тежки поражения на черния дроб от тройната терапия, съгласно докладваните значителни повишения на трансаминазите по време на клинични изпитвания, по данните на нашите пациенти можем да заключим, че тази терапия оказва минимално негативно влияние върху чернодробната функция и структура, което не е довело до спиране на терапията при нито един от пациентите. По кратка характеристика на продукта той не трябва да се прилага при пациенти с напреднала цироза. Вероятно е нужна нова система за оценка на пациентите с МВ и тежко чернодробно увреждане, за да могат да се лекуват с модулаторна терапия.

# 6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

В дисертационния труд са анализирани 167 пациента с диагностицирана МВ. Тази бройка представлява повече от половината български пациенти спрямо публикуваните данни от Европейския регистър на пациентите към ECFS (24, 115-121) за посоченият шест-годишен период (от януари 2015 до декември 2021 година), което означава, че представените резултати са репрезентативни за страната.

Проследявайки динамиката на пациентите през годините се наблюдава относително постоянен брой новодиагностицирани годишно – около 10-15 души, който обаче не покрива изчисления генетичен риск за болно от МВ новородено дете от 1 на 3000 раждания при около 60 000 раждания ежегодно в България (28). Вероятно част от пациентите остават недиагностицирани, което е още един аргумент в полза на необходимостта от неонатален скрининг. Неонаталният скрининг доказано е свързан с по-ранна диагноза и терапия, и съответно по-добър нутритивен и белодробен статус и качество на живот на пациентите (268).

Броят починали пациенти – 10 за последните 6 години, вероятно е подценен, тъй като е възможно част от недиагностицираните пациенти също да са починали и реалната бройка да е малко по-висока. Данните посочват положителен баланс на новодиагностицирани/починали пациенти, което обяснява и увеличението на бройката на пациентите през годините. Тези данни са отражение на подобрените здравни ресурси, медицинска грижа и въвеждането на нови медикаменти, осигуряващи по-продължителен живот на пациентите (174). Все пак МВ е заболяване с традиционно лимитирана продължителност на живота, но продължителността на живота расте с бързи темпове през последните години. От около 5 години повечето европейски държави докладват за по-голям процент възрастни, отколкото деца с МВ (115-121).

Заболяването, считано като детска болест с години, все повече ангажира специалисти за възрастни. За съжаление нашите данни показват, че все още изоставаме от тенденциите в големите Европейски държави, тъй като у нас все още процентът на децата надвишава този на възрастните с около 10%. Въвеждането на неонатален скрининг и изграждането на функциониращи центрове за възрастни с МВ биха могли да подпомогнат този процес. От друга страна оцеляването и по-продължителният живот при пациентите с МВ не зависят само от генотипа и тежестта на органните поражения, но и от социално-икономическите условия и здравната политика на държавата (160). България, макар и според световната банка считана като „богата“ държава член на ЕС, изостава значително по икономически и здравни индикатори.

При разпределението по пол е налице лек превес на пациентите от мъжки пол, което е подобно на средното при другите Европейски държави, като най-близо сме до Холандия, Гърция, Ирландия и Унгария по този показател (121). Повечето публикации изтъкват по-бързата прогресия на заболяването при женския пол, вероятно поради естрогените, и очаквана по-висока смъртност, което заедно с факта, че се раждат повече момчета отколкото момичета въобще, би могло да обясни лекия превес на момчетата и при нас (82, 159, 206). В Румъния обаче доминацията на мъжкия пол в броя на пациенти е почти двойна спрямо момичетата (121).

За разлика от половото съотношение, където се доближаваме до другите водещи държави от ЕС, данните за средна възраст на пациентите (18,04 години) са с над 6 години разлика в полза на страните от ЕС (121). Това е най-точното огледало на социално-икономическите условия и функционирането на здравната система в България (304). Противно на очакванията за по-висока средна възраст на момчетата, това не се откри в българската популация. Пациентите от женски пол са със сигнификантно по-висока средна възраст. Вероятно тези данни се дължат

на по-доброто придържане към терапията от момичетата в сравнение с момчетата, от друга страна вероятно има недиагностицирани възрастни мъже, които се проследяват като пациенти с традиционно „мъжки“ болести като ХОББ или бронхектазии (43, 223, 292). Всяка бременност на пациентка с МВ представлява предизвикателство, поради което жените се мобилизират и са по-стриктни по отношение на заболяването, за да достигнат до успешно раждане (30, 31). Подрастващите момчета са и по-склонни към по-рисково поведение като тютюнопушение, фактор който неизменно влошава здравните показатели и продължителността на живота при пациенти с МВ (157, 226).

Друга причина за по-ниската средна възраст в сравнение с ЕС вероятно е по-високата възраст на която пациентите се диагностицират – по-висока от средната за Европа, като водеща причина е липсата на национален неонатален скрининг за МВ. По-късната диагноза, както вече бе споменато, е свързана със забавено лечение и е рисков фактор за усложнения и лоша прогноза. Забавянето в диагнозата при момичетата е по-значима – с около 4 години по-късно. Възможно обяснение е наложения стереотип за страната за красота – където девойки с тегло под нормата се приемат за красиви и много по-късно се търси помощ и лечение, този проблем при девойките с МВ относно техния *„body image”* се дискутира и в България от повече от 20 години (27).

Последната причина за по-ниската средна възраст вероятно е свързана и с по-ниската средната възраст на смърт (27,51 години) при болните от МВ в България в сравнение с другите развити държави с над 10 години (121). Повечето от пациентите умират от заболяването, което потвърждава фаталитета, свързан с диагностициране на МВ. Освен диагностицирани по-рано, момчетата умират по-рано, и от всички получени данни можем да направим извода, че женският пол е свързан с повишена устойчивост у нас за разлика от публикациите в чужбина.

Разликата във възрастта на диагностика може да се обясни и с различните поводи за диагностициране – обективно най-рано се диагностицират децата с пренатална диагноза и с мекониум илеус, а най-късно пациентите с атипична МВ (бронхиектазии). Естествената еволюция на заболяването е причина за различната възраст на диагностициране спрямо най-поразените органи (217). При въвеждането на неонатален скрининг в рамките на 20 години, тези различия ще бъдат преодолени, и най-голямата част от пациентите с МВ ще бъдат диагностицирани в първия месец от живота си (297). Скринингът също така може да даде по-добри познания за разпространението на МВ, както и за генетичния произход в различни страни. Например чрез скрининг в Северна Македония е потвърдена най-често срещаната *CFTR* мутация, c.1521_1523delCTT (F508del) с обща честота от 70,6% със следващите най-често срещани мутации като c.1624G>T (G542X) (11,8%) и c.3909C> G (N1303K) (5,9%) (28, 145). Тези данни са много близки до данните за мутации със същите три водещи мутации, открити и при нашите пациенти – нещо очаквано от две съседни страни с обща история, и биха могли да послужат за бъдещата програма за скрининг по отношение на генетичния панел. Една от опасностите, които крие скринингa са децата с положителен такъв, но с клинично непотвърдена диагноза – те се наблюдават в рамките на първите 6 до 8 години от живота им. Близо 20% от тези деца еволюират по-късно към МВ (156, 283).

Генетичният анализ трябва да се съобрази с произхода на пациентите, както и етноса им. За ромския етнос в България до преди 3-4 години се считаше, че всички са хомозиготи по F508del, поради най-често избор на партньор в рамките на етноса (8, 28). По това те приличат на датчаните, където над 90% са хомозиготите по F508del (121). С промяната в социалните и етнически разбирания вече са доказани няколко деца с ромски произход, които не са хомозиготи (227). Пациентите хомозиготи по F508del се считат за по-тежко засегнати, но

голяма роля има, както вече се спомена, и социално-икономическото положение. Сравнението на ромски деца хомозиготи с деца хомозиготи не-роми, предполагаемо с по-добър социално-икономически и образователен статус, показва по-ниски антропометрични показатели, данни от функционалното изследване на дишането и по-малка възраст на проследяване (227). Разпределението на генотиповете хомозиготи, хетерозиготи и други за страната е подобно на другите европейски държави (121). Данните за доказаните мутации са изключително важни с оглед включване на пациентите на терапия с CFTRm.

В страни без масов неонатален скрининг пилотно е проведен генетичен скрининг при новородени с респираторен дистрес, но проучването установява, че 20% са CFTR хетерозиготи при новородените с респираторни проблеми спрямо 30% CFTR при новородени без респираторни проблеми (282). Счита се, че децата с МВ се раждат със здрав бял дроб, който започва да се уврежда под влияние на инфекциозни агенти (217). Неслучайно и в нашите данни се доказва по-късна възраст на диагноза при пациентите с предимно респираторни симптоми спрямо тези с гастроинтестинални оплаквания.

Въвеждането на скрининг за носителство сред населението, подобно на Израел и Австралия, ще позволи и пренатално изследване на носителите и свръхранна диагностика (297). Пренатален маркер са и хиперехогенните чревни бримки, но положителни за муковисцидоза са под 2% от изследваните проби (201).

До въвеждането на скрининг в България ще се разчита на клинична изява и най-ранна от тях е МИ, неслучайно тези деца се диагностицират по-рано от другите. Следващата група симптоми с ранна изява е невиреенето и хроничната диария. Липсата на ранни респираторни симптоми може да доведе до погрешна диагноза – напр. целиакия. Това е и причината целиакия и МВ да са били считани за едно заболяване до 30-те години на миналия век (248).

Тежката малнутриция е в основата и на ниските показатели за ИТМ при пациентите с МВ. Липсата на специализирани реимбурсирани храни в България, неправилното хранене, както и ниски дози на ензимна субституция са причина за значително по-лошите антропометрични показатели сред българските пациенти в сравнение с европейските деца и възрастни с МВ (5, 121).

Дневните нужди от панкреасни ензими спрямо възрастта потвърждават значително по-големи нужди при децата, спрямо възрастните, подобно и на други автори (60). При някои пациенти се налага доза многократно превишаваща, считаната в миналото за пределна, доза от 10000 IU/kg дневно, което позволява да твърдим уверено, че няма пределно допустима доза за малките деца и терапията трябва да се дозира според нуждите (92). Най-високи дози са необходими при пациенти с МИ, което потвърждава тезата, че тази група е с по-тежко протичане, изразена панкреасна екзокринна инсуфициенция и висок риск за развитие на CFLD. По-големите пациенти имат по-ниски ензимни нужди, но за сметка на това те са с по-лоша белодробна функция, което е знак за напреднало заболяване. Белодробните показатели зависят от антропометричните данни, придържането към терапията и екзацербациите на пациентите, но не зависят от повода за диагностициране.

Резултатите от настоящото проучване посочват, че няма как да се предвиди еволюцията на белодробното засягане от първата клинична изява. Дори по-късно начало на белодробната симптоматика, не означава, по-слабо засягане. Пациентите в България са с чувствително по-ниски стойности в сравнение с европейските пациенти (121). Много причини има за този факт, като едно възможно обяснение е по-късното започване на терапия с CFTRm (112). Факторите извън терапията, който влияят най-много на белодробните показатели, са антропометричните данни и инфекциозните агенти. В България се отчитат едни от най-високите

стойности на хронична колонизация с *Pseudomonas aeruginosa* спрямо данните за Европа (121), което може да обясни ниските показатели от функционалното изследване на дишането.

От лабораторните резултати, свързани с чернодробно увреждане (АЛАТ, АСАТ, ГГТ) е видно, че повечето пациенти са с нормални показатели. Това потвърждава становището на експертната група на американската фондация за МВ, че чернодробното засягане при тези пациенти често е „тихо“, и лабораторните тестове не могат да се използват самостоятелно за диагностициране на CFLD (171, 265). Възможните обяснения за тези находки са две – от една страна е налице стриктен чернодробен контрол на тези пациенти и адекватно високи дози ензимни препарати, както и ранно включване на урсодеоксихолева киселина към терапията, която доказано намалява прогресията на CFLD (2). По-ясно и дефинирано е поведението при пациентите с повишени стойности на ензимите. Според по-стари проучвания най-малко една абнормна стойност на АСАТ или АЛАТ е описана при 53% от пациентите (181). От друга страна поне една повишена стойност на ГГТ е наблюдавана при над една трета от пациентите с МВ до 21-годишна възраст (302).

Персистиращо повишение на чернодробните ензими налага задължително търсене на CFLD, докато преходни повишения могат да са свързани с недохранване, съпътстващо заболяване или лекарствено индуцирано чернодробно увреждане, и те не са специфични за CFLD. Това стои в основата на дългогодишния алгоритъм при неуточнен хепатит и повишени трансаминази всяко дете в Клиника по гастроентерология към СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ да бъде изследвано и с потен тест.

Освен чернодробното увреждане при МВ в рамките на холангиопатията, са налице и други усложнения, които могат да окажат влияние за развитие или усложнение на CFLD като хемоптиза,

инсулинозависим захарен диабет, пневмоторакс, алергична бронхопулмонална аспергилоза (АБПА) и аденокарцином. Последните две имат директно отношение към това увреждане, поради нуждата от потенциално хепатотоксично лечение (аспергилоза, аденокарцином), а пневмоторакс се наблюдава предимно при пациенти с чести белодробни екзацербации, на които са прилагани повече и по-продължителни антибиотични курсове. По този начин и наличието на пневмоторакс макар и индиректно се свързва с хепатотоксично лечение. Малкият брой пациенти с тези три усложнения в настоящия труд не позволяват задълбочена статистическа обработка. АБПА и диабетът са самостоятелни рискови фактори за хемоптиза (224).

По отношение на хемоптизата докладваният от нас процент е сравнително по-висок в сравнение с други държави (121). Причината за по-високия процент са вероятно по-лошите показатели от функционалното изследване на дишането в сравнение с европейските и съответно по-напредналото белодробно засягане. От друга страна, поради административни и финансови причини, често тези пациенти се изписват недоизлекувани от болница. Кръвохракът, освен с напреднало белодробно заболяване и бронхиектазии, се свързва и с нарушена чернодробна функция (коагулопатия, дефицит на витамин К) (147). Не установихме статистически значими разлики в чернодробните показатели на пациенти с МВ с или без кръвохрак. Установихме, че пациентите с кръвохрак са на по-голяма възраст и са с по-ниско тегло, най-вероятно поради по-трудно усвояване на мазнините, както и по-ниски дози на ензимно-заместващи препарати, но няма подобна зависимост за ръста и FEV1. До момента няма публикувани данни, които да обвържат чернодробното засягане и кръвохрака.

По отношение на диабета близо 9% от пациентите с МВ са с нарушен ОГТТ или с ИЗЗД. Ранните промени в глюкозния толеранс през от детството, подобно на диабета, са свързани с по-лош белодробен и

хранителен статус (295). Това рефлектира и върху чернодробните показатели. В групата на пациентите с диабет са най-високите стойности на ГГТ. Възможни фактори могат да бъдат някои медикаменти, степен на дехидратация, наличие на съпътстваща холестаза и други, когато е налице покачване на ГГТ. Още тук може да бъде направен извода, че при установяване на повишени стойности на ГГТ, пациентите с МВ следва да се насочват за ОГТТ и оценка на глюкозния метаболизъм. По отношение на теглото и ръста не установихме сигнификантна разлика спрямо нивата на кръвната глюкоза, но може да се приеме като тенденция диабетните пациенти и тези с нарушен ОГТТ да са с по-ниски тегло и ръст в сравнение с останалите. Тези данни потвърждават по-лошата прогноза за тези пациенти, описана и от други автори (254). По отношение на белодробните показатели, очаквано пациентите с диабет са с по-лоши резултати, което също способства за по-лошата прогноза.

Най-голям интерес в настоящето проучване и една от основните теми на дисертацията е влиянието на МИ при пациентите с МВ, както и значението на МИ като рисков фактор за развитие на CFLD. В нашата кохорта това са 8% от случаите. МИ е най-ранната клинична изява при МВ и се проявява при до 20% от пациентите, но в някои страни като Исландия разпространението може да бъде дори по-високо до 40% (220). За Европа средното разпространение е около 14% (121). Тази честота, вероятно е свързана с липсата на неонатален скрининг и възможен отчетен по-нисък общ брой пациенти, вместо реално съществуващите. Според някои по-ранни публикации се предполага, че децата с ниско тегло при раждане са изложени на по-висок риск от МИ, но подобен резултат не установихме в нашата кохорта. От друга страна стойностите на АСАТ и АЛАТ са сигнификантно по-високи при децата с МИ, което дава възможност да се направи извода, че е задължително проследяването за CFLD при тези пациенти. Не установихме статистически значима разлика за теглото и ръста при децата с МИ

спрямо тези без МИ, но това е за сметка на много по-високи дози ензимзаместителна терапия. Всички деца с МИ са с изразена панкреасна инсуфиценция, подобно на други публикации (252). Можем да направим извода, че за децата с МИ са необходими по-високи дози на ензимите за осигуряване на оптимален растеж и развитие, а оттам и по-добра прогноза за заболяването.

От направения допълнителен анализ относно възрастта на диагностициране, проследяване и смърт спрямо наличие или липса на МИ, се установяват много по-ниски стойности и за трите категории в групата с МИ. Няма нито един пациент с МИ, който да е достигнал пълнолетие в нашата кохорта. Може да се направи извода за по-ранна смърт при пациентите с МИ, което може да се използва като прогностичен маркер.

До този момент публикуваните данни за МИ като лош прогностичен фактор при МВ в медицинската литература са оскъдни и противоречиви, може би поради липса на правилно разграничение в тези статии за усложнен от неусложнен МИ, но повече от публикуваните статии защитават тезата, че при отсъствието на неонатален скрининг нашите пациенти с МВ с МИ се диагностицират по-рано и за съжаление имат по-ниска възраст на смърт и възраст при проследяване в сравнение с други пациенти с МВ (123, 170, 210, 218, 252, 307). Тези данни са в съюз с данните, публикувани от Oliveira et al. през 2002 година (215).

От анализа на нутритивния им статус и наличие на CFLD установихме сигнификантно по-лоши показатели за ИТМ (z-score) и по-голяма честота на чернодробно засягане при пациентите с МИ. Освен недохранването, което е по-разпространено при нашите пациенти с МИ, друг по-разпространен проблем е засягането на черния дроб, което е с ранна изява и тежест. Повечето от нашите пациенти с МИ имат абнормни показатели за чернодробно увреждане или ехографски промени, сочещи към CFLD. МИ е потвърден рисков фактор за развитие на CFLD, както и

мъжкият пол (293). В нашата кохорта мъжкият пол преобладава и по този начин може би това също допринася за по-високото разпространение на CFLD. Много е важно проблемите с черния дроб при пациенти с МИ да бъдат решени възможно най-скоро, тъй като терапията с CFTR-модулатор може да повлияе на чернодробната функция понякога неблагоприятно и по този начин тези пациенти да не могат да се възползват от нея (243).

Проследяването на пациентите с CFLD включва различни методи, но ехографското изследване остава основно. Установихме, че ехографското изследване е с много по-голяма диагностична стойност (статистически значима) и е задължително при проследяване на пациентите с МВ за ранно откриване и мониториране на CFLD. Тези данни са установени и от други автори. Ако чернодробните тестове се комбинират с отклонения в ултразвука, тогава специфичността за CFLD се подобрява от 41% на 74% (290).

От анализа на чернодробните показатели не се установява статистически значима разлика между стойностите на АЛАТ в различните групи, но такава е налична за всички други показатели. Не намерихме ясна причина за тази находка, вероятно липсата на разлика в групите се дължи на интермитиращо повишаване на АЛАТ при пациентите без CFLD, поради екзацербации, интеркурентни инфекции, лекарствени взаимодействия и други. Ранното включване на урсодеоксихолева киселина при пациентите още с първите установени ехографски отклонения, дори и при нормални трансаминази, вероятно също има роля за това. В допълнение, ГГТ и АСАТ може да са повишени за сметка на други нечернодробни фактори, които да влошават CFLD.

Не установихме сигнификантни разлики за възрастта на диагностициране, на проследяване и на смърт спрямо наличие или отсъствие на CFLD, което означава, че при добър контрол и навременна терапия, CFLD не може да се приеме като лош прогностичен белег, за

разлика от МИ. Публикация с по-малко изследвани пациенти счита, че е белег за повишена смъртност, но по наши данни наличието на CFLD се свързва с по-лоши белодробни показатели и съответно може да служи като прогностичен белег по-скоро за по-бърза прогресия на МВ, но не и за повишена смъртност (247). При всички случаи CFLD подлежи на стриктно проследяване и лечение (108).

За хепатотоксичния ефект на антибиотиците се знае от години, не случайно и в нашата кохорта пациентите на антибиотична терапия са по-често с CFLD (193).

Следвайки изградени собствени стандарти на центъра за поведение при тези пациенти, всички пациенти с цироза са на терапия с урсодеоксихолева киселина. Въпреки недостатъчните данни за ползата от приложението на медикамента, ние сме установили добър ефект, особено при напреднало заболяване (90). Напоследък се публикуват и данни за ефекта на урсодеоксихолевата киселина при превенция на чернодробни увреди от медикаменти, което още повече ни убеждава за нейното приложение (180).

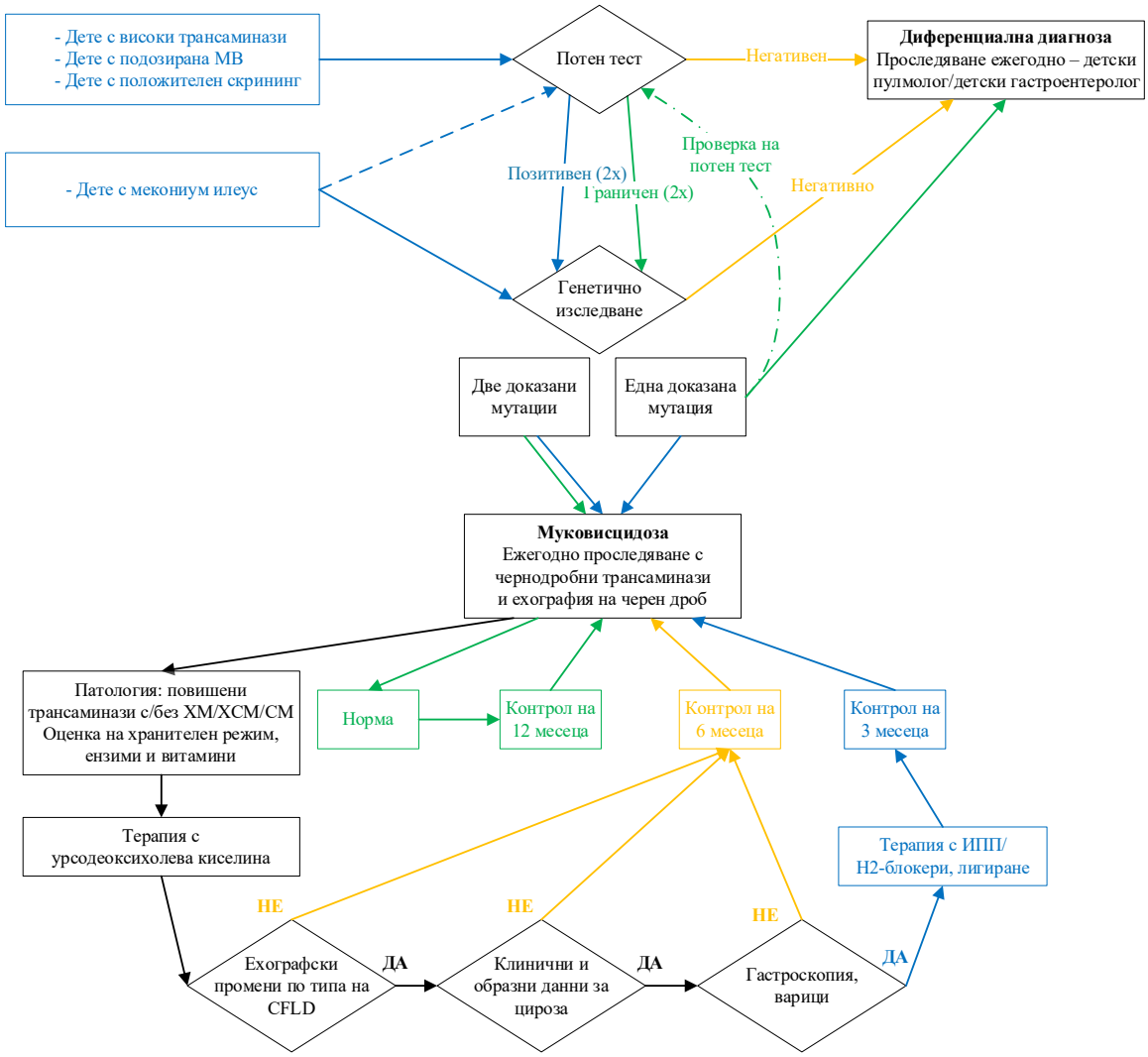
През последните години има редица публикации за ефекта на CFTRm терапията върху черния дроб на пациентите с МВ (61, 73). От нашите резултати, можем да заключим, че не се наблюдава прогресия на чернодробните ехографски промени при монотерапия и тя не оказва съществено негативно влияние върху чернодробната функция и структура. Дори цялостното подобрение при пациентите от терапията – подобрен нутритивен и белодробен статус, е свързано и с подобрение състоянието на черния дроб и постепенното му възстановяване.

Двойната терапия, подобно на монотерапията, не оказва съществено негативно влияние върху чернодробната функция и структура. При нея е възможно да се наблюдава временно повишение на стойностите на трансаминазите, след което те отново са в норма.

Тройната терапия е с по-изразени отклонения в показателите първоначално, но също се понася сравнително добре. Дори пациентите с тежко чернодробно засягане показват тенденция за по-голям спад на повишените стойности на трансаминазите в сравнение с тези с по-леко засягане. Вероятно поради възстановяването на функцията на CFTR и респективно регенеративните възможности на черния дроб.

Въпреки първоначално очакваните тежки поражения на черния дроб от тройната терапия, съгласно докладваните повишени трансаминази по време на клинични изпитвания, по данните на нашите пациенти можем да заключим, че тази терапия оказва минимално негативно влияние върху чернодробната функция и структура, което не е довело до спиране на терапията при нито един от пациентите. По кратка характеристика на продукта той не трябва да се прилага при пациенти с цироза клас С по скалата Child-Pugh, но вероятно тази класификация не е най-удачната за пациенти с муковисцидоза. Необходима е нова система за оценка на пациентите с МВ и тежко чернодробно увреждане, за да могат да се лекуват с модулаторна терапия.

Въз основа на посочените резултати и дискутираните практически проблеми при диагностиката и мониторирането на пациентите с МВ и CFLD, изготвихме алгоритъм на поведение в клинични условия, който да даде възможност за поставяне на навременна диагноза в условията на липсващ национален неонатален скрининг, стриктно проследяване на пациентите с МВ, ранна диагностика за установяване на CFLD с възможност за профилактика на усложненията и лечение, включително с CFTRm (Фигура 108).




Фигура 108. Диагностично-терапевтичен алгоритъм при МВ и CFLD (ХМ – хепатомегалия, ХСМ – хепатоспленомегалия, СМ – спленомегалия, ИПП – инхибитор на протонната помпа).

# 7. ИЗВОДИ

1. При пациентите с МВ белодробните показатели не зависят от повода за поставяне на диагнозата. Дори пациентът да е с добра белодробна функция в момента на диагностициране, това не означава, че тя ще се запази.
2. Мъжкият пол се диагностицира по-рано и при него е налице по-ранна смъртност.
3. Средната възраст за диагностициране на пациентите с МВ е по-висока от тази за Европа, което се свързва с липсата на програма за неонатален скрининг. Все още не достигаме очакваните около 20 новодиагностицирани пациенти годишно. Това води до забавяне на диагнозата и по-лоша прогноза за пациентите. Необходима е скринингова програма за България.
4. Установява се, че нормалните показатели за трансаминазна активност не изключват CFLD. Ехографското изследване е с много по-голяма диагностична стойност и е задължително при проследяване на пациентите с МВ за ранно откриване и мониториране на CFLD.
5. Установяват се по-лоши белодробни показатели (FEV1) при пациенти с CFLD, което е възможен прогностичен фактор за по-бърза прогресия на МВ.
6. Установява се, че пациентите МВ, при които е налице с диабет, са с най-високи стойности на ГГТ. Направен е извод, че при повишени стойности на ГГТ, пациентите с МВ следва да се насочват за ОГТТ и оценка на глюкозния метаболизъм.
7. Установява се, че пациентите с МИ са с по-високи стойности на АЛАТ и АСАТ при проследяване. При тях мониторирането за изява на CFLD трябва да следва стриктен и ясно определен алгоритъм.

8. Децата с МИ се нуждаят от по-високи дози ензимзаместителна терапия за осигуряване на оптимален растеж и развитие, а оттам и по-добра прогноза за заболяването. Прогностично пациентите с МИ са с по-ранна смъртност.
9. Не се наблюдава прогресия на чернодробните показатели и ехографските промени при пациенти с МВ на лечение с CFTR-модулатори. Терапията не оказва съществено негативно влияние върху чернодробната функция и структура. Необходима е нова система за оценка на CFLD при циротични пациенти.
10. При пациентите с тежко чернодробно засягане се наблюдава тенденция за по-голям спад на повишените стойности на трансаминазите в сравнение с тези с по-леко засягане. Направен е извода, че това се дължи на възстановяването на функцията на CFTR и респективно регенеративните възможности на черния дроб. Потвърждава се, че терапията с CFTR модулатори е благоприятна и за черния дроб.

# 8. ПРИНОСИ

## ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

- За първи път са описани и анализирани подробно данните за чернодробно засягане при българските пациенти с МВ
- За първи път са описани и анализирани подробно данните за мекониум илеус при българските пациенти с МВ
- За първи път са анализирани данни за пациентите с МВ спрямо повода за поставяне на диагнозата
- МИ е определен като важен прогностичен фактор за ранно чернодробно увреждане при пациенти с МВ и по-ранна смъртност
- Доказва се необходимост от по-високи дози ензимзаместителна терапия при пациенти с МИ и МВ
- Доказва се по-късна възраст на поставяне на диагнозата при пациентите с предимно респираторни спрямо тези с предимно гастроинтестинални симптоми в условията на липсващ масов неонатален скрининг за МВ
- За първи път са анализирани данни за чернодробното засягане при МВ и кръвохрак

## ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

- Потвърждава се диабета като рисков фактор за прогресия на чернодробното увреждане при МВ
- Потвърждава се, че нормалните стойности на чернодробните трансаминази не изключват наличие на CFLD

## ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

- Потвърждава се необходимостта от въвеждане на национална скринингова програма – масов неонатален скрининг за МВ

- Предложен е диагностично-терапевтичен алгоритъм за навременна оценка на състоянието на черния дроб и адекватно лечение при пациентите с МВ.

# 10. СПИСЪК НА ПУБЛИКУВАНИ ТРУДОВЕ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Yaneva N, **Baycheva M**, Kostova P, Papochieva V, Mileva S, Miteva D, Savov A, Petrova G. Preventable hazards from in vitro fertilization – a case series of CF patients from Bulgaria, *Balkan Journal of Medical Genetics*, 2023, 26 (1), 1-6 (IF 0.600, 2023)
2. Петрова Г, **Байчева М**, Папочиева В, Митева Д, Исаев В, Переновска П. Новости в терапията на пациентите с муковисцидоза, хомозиготи за най-честата мутация (делеция F508) в България. *Наука пулмология*, 2021, 16, бр. 4, с. 17-24
3. **Байчева** М, Петрова Г. Чернодробно засягане при муковисцидоза. *MedPost*, 2018, 4, бр. 30, с. 8-14
4. Karagiozova L, Petrova G, Georgiev T, Pamukova K, Mladenov B, Psederski H, Yaneva N, Savov A, Lazarova E, Hadzhiyski P, Kofinova D, Naydenov H, Shentova-Eneva R, **Baycheva M**. Meconium ileus in infants with cystic fibrosis – clinical characteristics, postoperative management and complications. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Abstracts from the 2022 EPSGHAN Meeting in Copenhagen, Volume 74, June 2022, S2, 232.
5. **Байчева М**, Папочиева В, Янева Н, Шахид П, Митева Д, Переновска П, Савов А, Петрова Г. Чернодробна функция и лекарства модулатори на муковисцидоза, кн. с резюмета, **Първа награда в постерна сесия,** XXIII-та Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, 5-7 май 2022 Слънчев бряг
6. Nikolova M, Gospodinova B, **Baycheva M,** Ketev K, Guenkova N, Nedkova V, Hristov I, Georgieva M, Perenovska P, Petrova G. P241 Cystic fibrosis-associated liver disease prevalence in Bulgarian cystic

fibrosis patients, *Journal of Cystic Fibrosis* 2020, 19, S124, presented at 43rd ECFS Conference 3-6 June 2020, Lyon, France

7. **Байчева М**, Янева Н, Исаев В, Янева П, Савов А, Петрова Г. Клинични характеристики и генотип при деца с мекониум илеус и кистична фиброза, XIV-ти Национален Конгрес по Педиатрия с международно участие, 27-30 септември 2018 Боровец

# 11. БИБЛИОГРАФИЯ


1. Ангелова Б, Узунова Й, Хаджидеков Г. Муковисцидоза в детска възраст – нискодозова компютърна томография за оценка на хроничните усложнения. *Рентгенология и радиология*, 58, 2019, N 4, с. 300-303
2. Галева И. Храносмилателни нарушения при муковисцидоза. *Педиатрия*, 52, 2012, N 3, с. 12-15
3. Генкова Н, Бошева М, Тодорова М, Маринов Б. Значение на азотния оксид в издишания въздух (FeNO) при деца с муковисцидоза като оценка на проведеното лечение с венозен антибиотик. *Наука пулмология*, 11, 2016, N 1, с. 20-24
4. Георгиева Е. Бронхиектазии без муковисцидоза у момиче на 14 години. *Педиатрия*, 57, 2017, N 4, с. 38-40
5. Исаев В, Зеленски С, Петрова Г, Переновска П. Немедицински проблеми при лечението на муковисцидоза със скъпоструващи, неразрешени за употреба в Република България лекарствени продукти. *Наука пулмология*, 15, 2020, N 3, с. 37-40
6. Исаев В, Кабакчиева Р, Переновска П, Маркова Р, Иванов Г. Диагностика и лечение на белодробни екзацербации при деца с муковисцидоза. *Наука пулмология*, 9, 2014, N 3, с. 10-16
7. Иванчева Д, Бошева М, Мантаркова Зл. Билиарна цироза при деца с муковисцидоза – кога и как да я установим. *Педиатрия*, 44, 2004, N 4, с. 31-33
8. Йорданова А, Ангеличева Д, Савов А, Ботева К. Генетични основи на муковисцидозата в България. *Педиатрия*, 32, 1993, N 3, с. 15-17
9. Кетев К, Шмилев Т. Усложнения на муковисцидозата свързани с дихателната система, изискващи спешно диагностично-терапевтично решение. *Мединфо*, 15, 2015, N 8, с. 26-29
10. Ковачева Ю, Кунчев К, Куфарджиева А, Галева И, Савов А. Чернодробно засягане при болни от муковисцидоза. *Педиатрия*, 39, 1999, No 1, 18-20
11. Маркова Р, Кабакчиева Р, Исаев В. Белодробни хеморагии при муковисцидоза – клинико-терапевтичен подход. *Педиатрия*, 56, 2016, N 2, с. 35-37
12. Начева М, Стоева Н, Пенев А, Савов А. Муковисцидоза в зряла възраст: клиничен опит. *Наука пулмология*, 8, 2013, N 3, с. 20-23

13. Недкова В. Муковисцидоза при деца – клинична и генетична характеристика. *Наука пулмология*, 5, 2010, N 1-2, с. 55-57
14. Недкова В. Клинична характеристика на пациенти с муковисцидоза. *Мединфо*, 13, 2013, N 12, с. 33-34
15. Николова М, Колева К, Рашева Н, Гълъбова М, Стоянова М, Шакола Ф, Иванов Г, Добруджанска Н, Георгиева М. Фенотип на мутацията L997F – рецидивиращ панкреатит при момче с муковисцидоза. *Педиатрия*, 60, 2020, N 4, с. 49-52
16. Николова М, Георгиева М, Петрова Г. SARS-CoV-2 и муковисцидоза. *Педиатрия*, 61, 2021, N 4, с. 42-47
17. Николова М, Гълъбова М, Колева К, Рашева Н, Добруджанска Н, Георгиева М. Управление на придържането към терапията при муковисцидоза – сравнение между двама пациенти. *Мединфо*, 23, 2023, N 1, с. 170-175
18. Панчева Р, Георгиева М. Европейски препоръки за мониторинг и оценка на хранителната грижа при муковисцидоза. *Практическа педиатрия*, 21, 2019, N 4, с. 28-30
19. Переновска П. Муковисцидоза – диагноза и лечение, *In spiro*, 4, 2011, N 3, с. 6-10
20. Петрова Г, Байчева М, Папочиева В, Митева Д, Исаев В, Переновска П. Новости в терапията на пациентите с муковисцидоза – хомозиготи за най-честата мутация (делеция F508) в България. *Наука пулмология*, 16, 2021, N 4, с. 17-24
21. Петрова Г, Митева Д, Исаев С, Переновска П. Резултати от лечение с ивакафтор при пациенти с „гейтинг“ мутации при муковисцидоза в България. Юбилейна Национална конференция за ОПЛ и педиатри, 2020, абстракти с. 57
22. Петрова Г, Переновска П. Бъдещето за пациентите с муковисцидоза. *Торакална Медицина* 2014, 4, N 4, 37-47
23. Петрова Г, Переновска П, Митева Д, Исаев В. Генно-модифицираща терапия при муковисцидоза и първи резултати в България. *Наука пулмология*, 15, 2020, N 1
24. Петрова Г, Переновска П, Митева Д, Исаев В, Байчева М, Янева П, Хинков Г, Христова Д, Стоева Н, Найденова А, Кетев К, Генкова Н, Бошева М, Недкова В, Иванов Я, Христов И, Георгиева М, Янева Н, Савов А. Българските

пациенти с муковисцидоза – актуални данни за 2017 година. XIX-та Национална конференция за ОПЛ и педиатри, 2018, абстракти с. 49

25. Петрова Г, Переновска П, Шопова С. Психосоциални проблеми при пациентите с муковисцидоза в България. *Педиатрия*, 58, 2018, N 3, с. 27-32
26. Петрова Г, Шопова С. Качество на живот и психични проблеми при деца с муковисцидоза. *Неврология и психиатрия*, год. XXXVIII, кн. 3/2007, 3-13
27. Петрова Г, Янева Н, Калчева М, Алексиев А, Михова Р, Атанасова С, Минчева Ц, Георгиева А, Стратева Т, Савов А. Пилотни данни от българския регистър на пациентите с муковисцидоза. *Редки болести и лекарства сираци* 2016;7(3):11-16
28. Савов А. Генетични дефекти при пациентите с муковисцидоза в България. *In spiro*, 2011, 3(15), 30-34
29. Христара-Пападопулу А, Янчева С. Сравнително изследване за ефективността на стандартна кинезитерапия и активен цикъл на дихателни техники при деца с муковисцидоза. *Кинезитерапия*, 4, 2004, N 1, с. 3-14
30. Чолакова К, Переновска П, Петрова Г. Репродуктивно здраве и муковисцидоза (Част 1) Подготовка и рискове, свързани с бременността. *Наука пулмология*, 13, 2018, N 1, с. 11-16.
31. Чолакова К, Переновска П, Петрова Г. Репродуктивно здраве и муковисцидоза (част 2) Подготовка и рискове, свързани с бременността. *Наука пулмология*, 13, 2018, N 2, с. 5-11.
32. Abidin N, Haq IJ, Gardner AI, Brodlie M. Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin Pharmacother*. 2017 Sep;18(13):1363-1371
33. Accurso FJ, Sontag MK, Wagener JS. Complications associated with symptomatic diagnosis in infants with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 2005;147:S37–S41
34. Allen L, Allen L, Carr SB, Davies G, Downey D, Egan M, Forton JT, Gray R, Haworth C, Horsley A, Smyth AR, Southern KW, Davies JC. Future therapies for cystic fibrosis. *Nat Commun.* 2023 Feb 8;14(1):693
35. Alton EW, Beekman JM, Boyd AC, Brand J, Carlon MS, Connolly MM, Chan M, Conlon S, Davidson HE, Davies JC, Davies LA, Dekkers JF, Doherty A, Gea-Sorli S, Gill DR, Griesenbach U, Hasegawa M, Higgins TE, Hironaka T, Hyndman L, McLachlan G, Inoue M, Hyde SC, Innes JA, Maher TM, Moran C, Meng C, Paul-Smith MC, Pringle IA, Pytel KM, Rodriguez-Martinez A, Schmidt AC, Stevenson BJ, Sumner-Jones SG, Toshner R, Tsugumine S, Wasowicz MW, Zhu J.

Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2017 Feb;72(2):137-147

36. Alton EW, Boyd AC, Davies JC, Gill DR, Griesenbach U, Harrison PT, Henig N, Higgins T, Hyde SC, Innes JA, Korman MS. Genetic medicines for CF: Hype versus reality. *Pediatr Pulmonol.* 2016 Oct;51(S44):S5-S17
37. Amaral MD, Kunzelmann K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Jul;28(7):334-41
38. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child.* 1938;56:344-99
39. Andersen DH, Hodges RC. Celiac syndrome. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with consideration of the etiology. *Am J Dis Child*. 1946, 72: 62-80
40. Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell.* 1991 Nov 15;67(4):775-84
41. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science.* 1991 Jul 12;253(5016):202-5
42. Aoyama T, Paik YH, Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010
43. Aryal S, Diaz-Guzman E, Mannino DM. COPD and gender differences: an update. *Transl Res.* 2013;162(4):208-218
44. Assis DN, Debray D. Gallbladder and bile duct disease in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2017 Nov;16 Suppl 2:S62-S69
45. Astudillo P. Historia de la fibrosis quística. *Neumol Pediátr.* 2010;5:2-3
46. Audrézet MP, Munck A, Scotet V, Claustres M, Roussey M, Delmas D, Férec C, Desgeorges M. Comprehensive CFTR gene analysis of the French cystic fibrosis screened newborn cohort: Implications for diagnosis, genetic counseling, and mutation-specific therapy. *Genet. Med.* 2015, 17, 108–116
47. Baker RD, Baker SS. Cystic Fibrosis-related Liver Disease: The Next Challenge. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020 Oct;71(4):421-422
48. Bear CE. A Therapy for Most with Cystic Fibrosis. *Cell.* 2020 Jan 23;180(2):211
49. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacology & Therapeutics* 145 (2015) 19–34

50. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, Burgel PR, Tullis E, Castaños C, Castellani C, Byrnes CA, Cathcart F, Chotirmall SH, Cosgriff R, Eichler I, Fajac I, Goss CH, Drevinek P, Farrell PM, Gravelle AM, Havermans T, Mayer-Hamblett N, Kashirskaya N, Kerem E, Mathew JL, McKone EF, Naehrlich L, Nasr SZ, Oates GR, O'Neill C, Pypops U, Raraigh KS, Rowe SM, Southern KW, Sivam S, Stephenson AL, Zampoli M, Ratjen F. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med.* 2020 Jan;8(1):65-124. Erratum in: *Lancet Respir Med.* 2019 Dec;7(12):e40
51. Beuers U, Hohenester S, de Buy Wenniger LJ, Kremer AE, Jansen PL, Elferink RP. The biliary HCO(3)(-) umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology.* 2010 Oct;52(4):1489-96
52. Beuers U, Maroni L, Elferink RO. The biliary HCO(3)(-) umbrella: experimental evidence revisited. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012 May;28(3):253-7
53. Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S25-37
54. Blackman SM, Tangpricha V. Endocrine Disorders in Cystic Fibrosis. *Pediatr Clin North Am.* 2016;63(4):699-708
55. Bodewes F. Cystic fibrosis liver disease and the enterohepatic circulation of bile acids. [S.l.]: [S.n.], 2014. 164 p.
56. Bodian M. Fibrocystic Disease of the Pancreas: A Congenital Disorder of Mucus Production-Mucosis. Heinemann, London 1952
57. Boëlle PY, Debray D, Guillot L, Clement A, Corvol H; French CF Modifier Gene Study Investigators. Cystic Fibrosis Liver Disease: Outcomes and Risk Factors in a Large Cohort of French Patients. *Hepatology.* 2019 Apr;69(4):1648-1656
58. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevínek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek M Jr, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhrmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S86-102

59. Borowitz D, Gelfond D, Maguiness K, Heubi JE, Ramsey B. Maximal daily dose of pancreatic enzyme replacement therapy in infants with cystic fibrosis: a reconsideration. *J Cyst Fibros.* 2013;12(6):784-785
60. Borowitz D, Stevens C, Brettman LR, Campion M, Wilschanski M, Thompson H; Liprotamase 767 Study Group. Liprotamase long-term safety and support of nutritional status in pancreatic-insufficient cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Feb;54(2):248-57
61. Bower JK, Volkova N, Ahluwalia N, Sahota G, Xuan F, Chin A, Weinstock TG, Ostrenga J, Elbert A. Real-world safety and effectiveness of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in people with cystic fibrosis: Interim results of a long-term registry-based study. *J Cyst Fibros.* 2023 Mar 22:S1569-1993(23)00066-8
62. Boyer J.L. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*, 2013;3:1035–78
63. Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, McColley SA, Rowe SM, Rietschel E, Huang X, Waltz D, Patel NR, Rodman D; VX09-809-102 study group. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2014 Jul;2(7):527-38
64. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med.* 2013 Apr;1(2):158-63
65. Brennan AL, Geddes DM, Gyi KM, Baker EH. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 209–222
66. Breuer O, Shteyer E, Wilschanski M, Perles Z, Cohen-Cymberknoh M, Kerem E, Shoseyov D. Hepatopulmonary Syndrome in Patients With Cystic Fibrosis and Liver Disease. *Chest.* 2016 Feb;149(2):e35-e38
67. Brigman C, Feranchak A. Liver involvement in cystic fibrosis. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2006;9:484–96
68. Brownell JN, Bashaw H, Stallings VA. Growth and nutrition in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 2019; 40: 775–91
69. Bruns WT, Connell TR, Lacey JA, Whisler KE. Test strip meconium screening for cystic fibrosis. *Am J Dis Child.* 1977 Jan;131(1):71-3
70. Burgel PR, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, Elborn JS; ERS/ECFS Task Force on Provision of Care for Adults with Cystic Fibrosis in Europe. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J.* 2015 Jul;46(1):133-41

71. Cadamuro M, Fiorotto R, Strazzabosco M. Liver biology and pathobiology. Wiley 2020: 391-407
72. Caley LR, White H, de Goffau MC, Floto RA, Parkhill J, Marsland B, Peckham DG. Cystic Fibrosis-Related Gut Dysbiosis: A Systematic Review. *Dig Dis Sci.* 2023 May;68(5):1797-1814
73. Calvo PL, Giugliano L, Evangelista A, Bignamini E, Pinon M. Effects of CFTR modulator therapies on liver stiffness and bile flow: A single-centre experience. *J Hepatol.* 2023 Feb 17:S0168-8278(23)00094-6
74. Calvo-Lerma J, Hulst JM, Asseiceira I, Claes I, Garriga M, Colombo C, Fornés V, Woodcock S, Martins T, Boon M, Ruperto M, Walet S, Speziali C, Witters P, Masip E, Barreto C, de Boeck K, Ribes-Koninckx C; MyCyFAPP Project. Nutritional status, nutrient intake and use of enzyme supplements in paediatric patients with Cystic Fibrosis; a European multicentre study with reference to current guidelines. *J Cyst Fibros.* 2017 Jul;16(4):510-518
75. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 2015; 14: 419–30
76. Carlon MS, Vidović D, Birket S. Roadmap for an early gene therapy for cystic fibrosis airway disease. *Prenat Diagn.* 2017 Dec;37(12):1181-1190
77. Carlon MS, Vidović D, Dooley J, da Cunha MM, Maris M, Lampi Y, Toelen J, Van den Haute C, Baekelandt V, Deprest J, Verbeken E, Liston A, Gijsbers R, Debyser Z. Immunological ignorance allows long-term gene expression after perinatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to murine airways. *Hum Gene Ther.* 2014 Jun;25(6):517-28
78. Castellani C, De Boeck K, De Wachter E, Sermet-Gaudelus I, Simmonds NJ, Southern KW; ECFS Diagnostic Network Working Group. ECFS standards of care on CFTR-related disorders: Updated diagnostic criteria. *J Cyst Fibros.* 2022 Nov;21(6):908-921
79. Castellani C, Picci L, Tridello G, Casati E, Tamanini A, Bartoloni L, Scarpa M, Assael BM; Veneto CF Lab Network. Cystic fibrosis carrier screening effects on birth prevalence and newborn screening. *Genet Med.* 2016 Feb;18(2):145-51
80. Chen Q, Shen Y, Zheng J. A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. *Animal Model Exp Med.* 2021 Sep 16;4(3):220-232
81. Cheng K, Ashby D, Smyth RL. Ursodeoxycholic acid for cystic fibrosis-related liver disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Sep 11;9(9):CD000222

82. Chotirmall SH, Smith SG, Gunaratnam C, Cosgrove S, Dimitrov BD, O'Neill SJ, Harvey BJ, Greene CM, McElvaney NG. Effect of estrogen on pseudomonas mucoidy and exacerbations in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2012 May 24;366(21):1978-86
83. Ciet P, Bertolo S, Ros M, Casciaro R, Cipolli M, Colagrande S, Costa S, Galici V, Gramegna A, Lanza C, Lucca F, Macconi L, Majo F, Paciaroni A, Parisi GF, Rizzo F, Salamone I, Santangelo T, Scudeller L, Saba L, Tomà P, Morana G. State-of-the-art review of lung imaging in cystic fibrosis with recommendations for pulmonologists and radiologists from the "iMAging managEment of cySTic fibROsis" (MAESTRO) consortium. *Eur Respir Rev.* 2022 Mar 23;31(163):210173
84. Clancy JP, Jain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:593–7
85. Clunes MT, Boucher RC. Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2007;4(2):63-72
86. Coakley R, Stutts M, Bush A, Alton EWFW, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A (eds): Cystic Fibrosis in the 21st Century. *Prog Respir Res.* Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 45-53
87. Cohen-Cymberknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax.* 2013 Dec;68(12):1157-62
88. Collawn JF, Matalon S. CFTR and lung homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307: L917–23
89. Collins FS, Riordan JR, Tsui LC. The cystic fibrosis gene: isolation and significance. *Hosp Pract (Off Ed).* 1990 Oct 15;25(10):47-57
90. Colombo C, Alicandro G, Oliver M, Lewindon PJ, Ramm GA, Ooi CY, Alghisi F, Kashirskaya N, Kondratyeva E, Corti F, Padoan R, Asherova I, Evans H, de Monestrol I, Strandvik B, Lindblad A; CF UDCA study group. Ursodeoxycholic acid and liver disease associated with cystic fibrosis: A multicenter cohort study. *J Cyst Fibros.* 2022 Mar;21(2):220-226
91. Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, Morabito A, Costantini D, Padoan R, Giunta A. Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology.* 2002 Dec;36(6):1374-82
92. Colombo C, Ellemunter H, Houwen R, Munck A, Taylor C, Wilschanski M. Guidelines for the diagnosis and management of distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2011; 10 (suppl 2): S24–28

93. Colombo C, Ramm GA, Lindblad A, Corti F, Porcaro L, Alghisi F, Asherova I, Evans H, Kashirskaya N, Kondratyeva E, Lewindon PJ, de Monestrol I, Oliver M, Ooi CY, Padoan R, Shankar S, Alicandro G. Characterization of CFTR mutations in people with cystic fibrosis and severe liver disease who are not eligible for CFTR modulators. *J Cyst Fibros.* 2023 Mar;22(2):263-265
94. Connett GJ. Lumacaftor-ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis: design, development and place in therapy. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:2405–2412
95. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet.* 1979 Mar 3;1(8114):472-4
96. Curry MP, Hegarty JE. The gallbladder and biliary tract in cystic fibrosis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005 May;7(2):147-53
97. Cystic Fibrosis Canada. The Canadian Cystic Fibrosis Registry. 2021 Annual Data report. 2023
98. Cystic Fibrosis Foundation, Ad Hoc Committee Task Force on Neonatal Screening Neonatal screening for cystic fibrosis: Position paper. *Pediatrics.* 1983;72:741–745
99. Cystic Fibrosis Foundation. National Patient Registry Annual Data Report. 2015
100. Daigneault J, Aubin G, Simard F, De Braekeleer M. Genetic epidemiology of cystic fibrosis in Saguenay-Lac-St-Jean (Quebec, Canada). *Clin Genet.* 1991 Oct;40(4):298-303
101. Dana J, Debray D, Beaufrère A, Hillaire S, Fabre M, Reinhold C, Baumert TF, Berteloot L, Vilgrain V. Cystic fibrosis-related liver disease: Clinical presentations, diagnostic and monitoring approaches in the era of CFTR modulator therapies. *J Hepatol.* 2022 Feb;76(2):420-434
102. Dana J, Debray D, Vilgrain V. Reply to: "The effects of CFTR modulator therapies on liver stiffness and bile flow: A single centre experience". *J Hepatol.* 2023 Apr 10:S0168-8278(23)00222-2
103. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016 Aug;4(8):662-674
104. De Boeck K, Munck A, Walker S, Faro A, Hiatt P, Gilmartin G, Higgins M. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros.* 2014 Dec;13(6):674-80
105. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014 Jul;13(4):403-9

106. Debray D, El Mourabit H, Merabtene F, Brot L, Ulveling D, Chrétien Y, Rainteau D, Moszer I, Wendum D, Sokol H, Housset C. Diet-Induced Dysbiosis and Genetic Background Synergize With Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficiency to Promote Cholangiopathy in Mice. *Hepatol Commun.* 2018 Oct 10;2(12):1533-1549

107. Debray D, Kelly D, Houwen R, Strandvik B, Colombo C. Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Cyst Fibros.* 2011; 10(suppl 2): S29e36

108. Debray D, Narkewicz MR, Bodewes FAJA, Colombo C, Housset C, de Jonge HR, Jonker JW, Kelly DA, Ling SC, Poynard T, Sogni P, Trauner M, Witters P, Baumann U, Wilschanski M, Verkade HJ. Cystic Fibrosis-related Liver Disease: Research Challenges and Future Perspectives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Oct;65(4):443-448

109. Demeyer S, De Boeck K, Witters P, Cosaert K. Beyond pancreatic insufficiency and liver disease in cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 2016;175: 881–94

110. Donaldson SH, Pilewski JM, Griese M, Cooke J, Viswanathan L, Tullis E, Davies JC, Lekstrom-Himes JA, Wang LT; VX11-661-101 Study Group. Tezacaftor/Ivacaftor in Subjects with Cystic Fibrosis and F508del/F508del-CFTR or F508del/G551D-CFTR. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018 Jan 15;197(2):214-224

111. Dörk T, Macek M Jr, Mekus F, Tümmler B, Tzountzouris J, Casals T, Krebsová A, Koudová M, Sakmaryová I, Macek M Sr, Vávrová V, Zemková D, Ginter E, Petrova NV, Ivaschenko T, Baranov V, Witt M, Pogorzelski A, Bal J, Zékanowsky C, Wagner K, Stuhrmann M, Bauer I, Seydewitz HH, Neumann T, Jakubiczka S. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet.* 2000 Mar;106(3):259-68

112. Drevinek P, Stepankova K, Wozniacki L, Halasz A, Petrova G, Makukh H, Belinska A, Sands D. Availability of CFTR modulators in countries of Eastern Europe: The reality in 2022. *J Cyst Fibros.* 2022 Nov;21(6):1082-1083

113. Duchatel F, Muller F, Oury JF, Mennesson B, Boue J, Boue A. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: ultrasonography of the gallbladder at 17-19 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther.* 1993 Jan-Feb;8(1):28-36

114. Durieu I, Pellet O, Simonot L, Durupt S, Bellon G, Durand DV, Minh VA. Sclerosing cholangitis in adults with cystic fibrosis: a magnetic resonance cholangiographic prospective study. *J Hepatol.* 1999 Jun;30(6):1052-6

115. ECFSPR Annual Report 2015, Zolin A, Naehrlich L, van Rens J et al, 2017
116. ECFSPR Annual Report 2016, Orenti A, Zolin A, Naehrlich L, van Rens J et al, 2018
117. ECFSPR Annual Report 2017, Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, van Rens J et al, 2019
118. ECFSPR Annual Report 2018, Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, Jung A, van Rens J et al, 2020
119. ECFSPR Annual Report 2019, Orenti A, Zolin A, Jung A, van Rens J et al, 2021
120. ECFSPR Annual Report 2020, Orenti A, Zolin A, Jung A, van Rens J et al, 2022
121. ECFSPR Annual Report 2021, Orenti A, Zolin A, Jung A, van Rens J et al, 2023
122. Efrati O, Barak A, Modan-Moses D, Augarten A, Vilozni D, Katznelson D, Szeinberg A, Yahav J, Bujanover Y. Liver cirrhosis and portal hypertension in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Oct;15(10):1073-8
123. Efrati O, Nir J, Fraser D, Cohen-Cymberknoh M, Shoseyov D, Vilozni D, Modan-Moses D, Levy R, Szeinberg A, Kerem E, Rivlin J. Meconium ileus in patients with cystic fibrosis is not a risk factor for clinical deterioration and survival: the Israeli Multicenter Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Feb;50(2):173-8
124. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2016 Nov 19;388(10059):2519-2531
125. Elborn JS, Ramsey BW, Boyle MP, Konstan MW, Huang X, Marigowda G, Waltz D, Wainwright CE; VX-809 TRAFFIC and TRANSPORT study groups. Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis. *Lancet Respir Med.* 2016 Aug;4(8):617-626
126. Ellis J, Bhatia M. iPSC technology: platform for drug discovery. Point. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 May;89(5):639-41
127. Esterly JR, Oppenheimer EH. Observations in cystic fibbrosis of the pancreas. I. The gallbladder. Bull Johns Hopkins Hosp. 1962 May;110:247-55
128. Esterly JR, Spicer SS. Mucin histochemistry of human gallbladder: changes in adenocarcinoma, cystic fibrosis, and cholecystitis. *J Natl Cancer Inst.* 1968 Jan;40(1):1-12

129. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1997;10(2):135-54

130. Fabris L, Fiorotto R, Spirli C, Cadamuro M, Mariotti V, Perugorria MJ, Banales JM, Strazzabosco M. Pathobiology of inherited biliary diseases: a roadmap to understand acquired liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Aug;16(8):497-511

131. Fanconi G, Prader A, Rossi E. La fibrose pancréatique avec bronchectasies; dysporia entero-bronco-pancreatica, mucoviscidose [Pancreatic fibrosis with bronchiectasis; dysporia entero-bronco-pancreatica, cystic fibrosis]. *Rev Int Hepatol.* 1956;6(3):359-77. French

132. Farber S, Shwachmann H, Maddock CL. Pancreatic function and disease in early life. I. Pancreatic enzyme activity and the celiac syndrome. *J Clin Invest.* 1943;20:827-33

133. Farrell PM, Lai HJ, Li Z, Kosorok MR, Laxova A, Green CG, Collins J, Hoffman G, Laessig R, Rock MJ, Splaingard ML. Evidence on improved outcomes with early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening: enough is enough! *J Pediatr.* 2005 Sep;147(3 Suppl):S30-6

134. Farrell PM, White TB, Howenstine MS, Munck A, Parad RB, Rosenfeld M, Sommerburg O, Accurso FJ, Davies JC, Rock MJ, Sanders DB, Wilschanski M, Sermet-Gaudelus I, Blau H, Gartner S, McColley SA. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Screened Populations. *J Pediatr.* 2017 Feb;181S:S33-S44.e2

135. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017 Feb;181S:S4-S15.e1

136. Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V, Fabris L, Spirli C, Strazzabosco M. Src kinase inhibition reduces inflammatory and cytoskeletal changes in ΔF508 human cholangiocytes and improves cystic fibrosis transmembrane conductance regulator correctors efficacy. *Hepatology.* 2018 Mar;67(3):972-988

137. Fiorotto R, Scirpo R, Trauner M, Fabris L, Hoque R, Spirli C, Strazzabosco M. Loss of CFTR affects biliary epithelium innate immunity and causes TLR4-NF-κB-mediated inflammatory response in mice. *Gastroenterology.* 2011 Oct;141(4):1498-508, 1508.e1-5

138. Fiorotto R, Strazzabosco M. Cystic Fibrosis-Related Liver Diseases: New Paradigm for Treatment Based on Pathophysiology. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2016 Nov 30;8(5):113-116

139. Fiorotto R, Strazzabosco M. Pathophysiology of Cystic Fibrosis Liver Disease: A Channelopathy Leading to Alterations in Innate Immunity and in Microbiota. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;8(2):197-207

140. Fiorotto R, Villani A, Kourtidis A, Scirpo R, Amenduni M, Geibel PJ, Cadamuro M, Spirli C, Anastasiadis PZ, Strazzabosco M. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls biliary epithelial inflammation and permeability by regulating Src tyrosine kinase activity. *Hepatology.* 2016 Dec;64(6):2118-2134

141. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, Dargitz CT, Wright R, Khanna A, Gage FH, Verma IM. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep.* 2015 Sep 1;12(9):1385-90

142. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, Elborn JS, Boucher RC, Tunney MM, Wolfgang MC. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS One.* 2012;7(9):e45001

143. Freeman AJ, Sellers ZM, Mazariegos G, Kelly A, Saiman L, Mallory G, Ling SC, Narkewicz MR, Leung DH. A Multidisciplinary Approach to Pretransplant and Posttransplant Management of Cystic Fibrosis-Associated Liver Disease. *Liver Transpl.* 2019 Apr;25(4):640-657

144. Frías JP, Ruiz EP, López Castillo MDC, García PC. The History of Cystic Fibrosis. *Open J Pediatr Child Health*. 2019, 4(1):001-006

145. Fustik S, Anastasovska V, Plaseska-Karanfilska D, Stamatova A, Spirevska L, Pesevska M, Terzikj M, Vujovic M. Two Years of Newborn Screening for Cystic Fibrosis in North Macedonia: First Experience. *Balkan J Med Genet.* 2021 Jul 27;24(1):41-46

146. Galietta LJ. Managing the underlying cause of cystic fibrosis: a future role for potentiators and correctors. *Pediatr Drugs.* 2013;15:393–402

147. Gavioli E, Aung CC. Haemoptysis management in cystic fibrosis: A case report and treatment pathway. *J Clin Pharm Ther.* 2020;45(4):845-847

148. Gehrig S, Duerr J, Weitnauer M, Wagner CJ, Graeber SY, Schatterny J, Hirtz S, Belaaouaj A, Dalpke AH, Schultz C, Mall MA. Lack of neutrophil elastase

reduces inflammation, mucus hypersecretion, and emphysema, but not mucus obstruction, in mice with cystic fibrosis-like lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 May 1;189(9):1082-92

149. Gentzsch M, Mall MA. Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest.* 2018 Aug;154(2):383-393

150. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med.* 2014; 34: 197–217

151. Glaser S, Francis H, Demorrow S, Lesage G, Fava G, Marzioni M, Venter J, Alpini G. Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 14;12(22):3523-36

152. Gomes A, Hutcheon D, Ziegler J. Association between fat-free mass and pulmonary function in patients with cystic fibrosis: a narrative review. *Nutr Clin Pract.* 2019; 34: 715–27

153. Graeber SY, Dopfer C, Naehrlich L. Effects of lumacaftor/ivacaftor therapy on CFTR function in Phe508del homozygous patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197(11):1433–1442

154. Gregg RG, Wilfond BS, Farrell PM, Laxova A, Hassemer D, Mischler EH. Application of DNA analysis in a population-screening program for neonatal diagnosis of cystic fibrosis (CF): Comparison of screening protocols. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;52:616–626

155. Grosse SD, Boyle CA, Botkin JR, Comeau AM, Kharrazi M, Rosenfeld M, Wilfond BS; CDC. Newborn screening for cystic fibrosis: evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. MMWR Recomm Rep. 2004 Oct 15;53(RR-13):1-36

156. Gunnett MA, Baker E, Mims C, Self ST, Gutierrez HH, Guimbellot JS. Outcomes of children with cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis/CFTR related metabolic syndrome. *Front Pediatr.* 2023;11:1127659

157. Hamberger ES, Halpern-Felsher B. Concern over tobacco and marijuana perceptions and use among adolescents and young adults with cystic fibrosis. *Addict Behav.* 2023;142:107669

158. Han Y, Glaser S, Meng F, Francis H, Marzioni M, McDaniel K, Alvaro D, Venter J, Carpino G, Onori P, Gaudio E, Alpini G, Franchitto A. Recent advances in the morphological and functional heterogeneity of the biliary epithelium. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013 May;238(5):549-65

159. Harness-Brumley CL, Elliott AC, Rosenbluth DB, Raghavan D, Jain R. Gender differences in outcomes of patients with cystic fibrosis. *J Womens Health (Larchmt).* 2014;23(12):1012-1020

160. Hatziagorou E, Orenti A, Drevinek P, Kashirskaya N, Mei-Zahav M, De Boeck K; ECFSPR. Electronic address: ECFS-Patient.Registry@uz.kuleuven.ac.be; ECFSPR. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis-data from the European cystic fibrosis society patient registry. *J Cyst Fibros.* 2020 May;19(3):376-383

161. Haworth CS, Webb AK, Elkin SL, Hodson ME, Compston JE, Selby PL. Cystic fibrosis related low bone density. *Arch Dis Child.* 2000 Oct;83(4):369

162. Hermie L, Biervliet SV, Hoorens A, Cauwenberghe LV, Robberecht E, Defreyne L. Pre-emptive transjugular intrahepatic portosystemic shunt in pediatric cystic fibrosis-related liver disease and portal hypertension: prospective long-term results. *Diagn Interv Radiol.* 2023 Mar 20

163. Heubi JE, Schaeffer D, Ahrens RC, Sollo N, Strausbaugh S, Graff G, Jain R, Witte S, Forssmann K. Safety and Efficacy of a Novel Microbial Lipase in Patients with Exocrine Pancreatic Insufficiency due to Cystic Fibrosis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Pediatr.* 2016 Sep;176:156-161.e1

164. Hodson M, Bush A. Respiratory Disease: Noninfectious Complications; Hodson and Geddes' Cystic Fibrosis (4th ed.). Bush A, Bilton D, Hodson M. (Eds). *CRC Press.* 2016

165. Hohenester S, Wenniger LM, Jefferson DM, Oude Elferink RP, Beuers U. Biliary bicarbonate secretion constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in man. *Dig Dis.* 2011;29(1):62-5

166. Hohenester S, Wenniger LM, Paulusma CC, van Vliet SJ, Jefferson DM, Elferink RP, Beuers U. A biliary HCO3- umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. *Hepatology.* 2012 Jan;55(1):173-83

167. Højte C, Jørgensen MH, Jensen F, Katzenstein TL, Skov M. Extended Screening for Cystic Fibrosis-related Liver Disease Including Elastography in Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020 Nov;71(5):663-668

168. Houwen RH, van der Doef HP, Sermet I, Munck A, Hauser B, Walkowiak J, Robberecht E, Colombo C, Sinaasappel M, Wilschanski M; ESPGHAN Cystic Fibrosis Working Group. Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a

multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Jan;50(1):38-42

169. Janahi IA, Rehman A, Al-Naimi AR. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Ann Thorac Med.* 2017 Apr-Jun;12(2):74-82

170. Johnson JA, Bush A, Buchdahl R. Does presenting with meconium ileus affect the prognosis of children with cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol.* 2010 Oct;45(10):951-8

171. Kamal N, Surana P, Koh C. Liver disease in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2018 May;34(3):146-151

172. Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology.* 2000;31:555–61

173. Kelly D. Liver Disease in the young adult with cystic fibrosis. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2014 Oct 24;4(4):84-85

174. Keogh RH, Tanner K, Simmonds NJ, Bilton D. The changing demography of the cystic fibrosis population: forecasting future numbers of adults in the UK. *Sci Rep.* 2020;10(1):10660

175. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1073-80

176. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Elborn JS, Melotti P, Bronsveld I, Fajac I, Malfroot A, Rosenbluth DB, Walker PA, McColley SA, Knoop C, Quattrucci S, Rietschel E, Zeitlin PL, Barth J, Elfring GL, Welch EM, Branstrom A, Spiegel RJ, Peltz SW, Ajayi T, Rowe SM; Cystic Fibrosis Ataluren Study Group. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2014 Jul;2(7):539-47

177. Khuroo MS, Khuroo NS, Farahat KL, Khuroo YS, Sofi AA, Dahab ST. Meta-analysis: endoscopic variceal ligation for primary prophylaxis of oesophageal variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Feb 15;21(4):347-61

178. Kisseleva T , Brenner TA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22 Suppl 1:S73-8

179. Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z, Farrell PM. Clarification of laboratory and clinical variables that influence cystic fibrosis

newborn screening with initial analysis of immunoreactive trypsinogen. *Pediatrics.* 2009 Feb;123(2):e338-46

180. Koc S, Aktas A, Sahin B, Ozer H, Zararsiz GE. Protective effect of ursodeoxycholic acid and resveratrol against tacrolimus induced hepatotoxicity. *Biotech Histochem.* 2023 Jun 28:1-8

181. Koh C, Sakiani S, Surana P, Zhao X, Eccleston J, Kleiner DE, Herion D, Liang TJ, Hoofnagle JH, Chernick M, Heller T. Adult-onset cystic fibrosis liver disease: Diagnosis and characterization of an underappreciated entity. *Hepatology.* 2017 Aug;66(2):591-601

182. Kosorok MR, Wei WH, Farrell PM. The incidence of cystic fibrosis. *Stat Med.* 1996 Mar 15;15(5):449-62

183. Lafoeste H, Regard L, Martin C, Chassagnon G, Burgel PR. Complications aiguës respiratoires et non respiratoires chez l'adulte mucoviscidosique [Acute pulmonary and non-pulmonary complications in adults with cystic fibrosis]. *Rev Pneumol Clin.* 2018 Oct;74(5):267-278. French

184. Lamireau T, Monnereau S, Martin S, Marcotte J-E, Winnock M, Alvarez F. Epidemiology of liver disease in cystic fibrosis: a longitudinal study. *J Hepatol.* 2004;41:920–925

185. Leewen L, Magoffin AK, Fitzgerald DA, Cipolli M, Gaspin KJ. Cholestasis and meconium ileus in infants with cystic fibrosis and their clinical outcomes. *Arch Dis Child.* 2014;99:443–7

186. Levitte S, Fuchs Y, Wise R, Sellers ZM. Effects of CFTR modulators on serum biomarkers of liver fibrosis in children with cystic fibrosis. *Hepatol Commun.* 2023 Jan 20;7(2):e0010

187. Leung DH, Narkewicz MR. Cystic Fibrosis-related cirrhosis. *J Cyst Fibros.* 2017 Nov;16 Suppl 2:S50-S61

188. Libeert D, Declercq D, Wanyama S, Thomas M, Van Daele S, De Baets F, Van Biervliet S. The effect of enteral tube feeding in cystic fibrosis: A registry based study. *J Cyst Fibros.* 2018 Mar;17(2):264-270

189. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Cystic Fibrosis Agents, Updated 2022

190. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol.* 2020 Feb 21;10:1662

191. Lowe CU, May CD, Reed SC. Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features. *Am J Dis Child.* 1949 Sep;78(3):349-74

192. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Lealet T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical Biochemistry.* 45 (2012) 1132–1144

193. Ma J, Ghabril M, Chalasani N. Drug-Induced Acute-on-Chronic Liver Failure: Challenges and Future Directions. *Clin Liver Dis.* 2023;27(3):631-648

194. Mall MA, Hartl D. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur Respir J.* 2014; 44:1042–54

195. Mall MA, Schultz C. A new player in the game: epithelial cathepsin S in early cystic fi brosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 190: 126–27

196. Martonosi ÁR, Soós A, Rumbus Z, Hegyi P, Izsák V, Pázmány P, Imrei M, Váncsa S, Szakács Z, Párniczky A. Non-invasive Diagnostic Tests in Cystic Fibrosis-Related Liver Disease: A Diagnostic Test Accuracy Network Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne).* 2021 Jul 27;8:598382

197. Marzioni M, Glaser SS, Francis H, Phinizy JL, LeSage G, Alpini G. Functional heterogeneity of cholangiocytes. Semin Liver Dis. 2002 Aug;22(3):227-40

198. McKay K, Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis offers an advantage over symptomatic diagnosis for the long term benefit of patients: the motion for. *Paediatr Respir Rev.* 2008;9(4):290–4

199. McKone EF, Borowitz D, Drevinek P, Griese M, Konstan MW, Wainwright C, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Plant B, Munck A, Jiang Y, Gilmartin G, Davies JC; VX08-770-105 (PERSIST) Study Group. Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: a phase 3, open-label extension study (PERSIST). *Lancet Respir Med.* 2014 Nov;2(11):902-910

200. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2003 May 17;361(9370):1671-6

201. Mekki C, Aissat A, Mirlesse V, Mayer Lacrosniere S, Eche E, Le Floch A, Whalen S, Prud'Homme C, Remus C, Funalot B, Castaigne V, Fanen P, de Becdelièvre A. Prenatal Ultrasound Suspicion of Cystic Fibrosis in a Multiethnic

Population: Is Extensive CFTR Genotyping Needed? *Genes (Basel).* 2021 Apr 29;12(5):670

202. Mendizabal M, Reddy KR, Cassuto J, Olthoff KM, Faust TW, Makar GA, Rand EB, Shaked A, Abt PL. Liver transplantation in patients with cystic fibrosis: analysis of United Network for Organ Sharing data. *Liver Transpl.* 2011 Mar;17(3):243-50

203. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, Ramsey BW, Taylor-Cousar JL, Tullis E, Vermeulen F, Marigowda G, McKee CM, Moskowitz SM, Nair N, Savage J, Simard C, Tian S, Waltz D, Xuan F, Rowe SM, Jain R; VX17-445-102 Study Group. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med.* 2019 Nov 7;381(19):1809-1819

204. Miller AC, Comellas AP, Hornick DB, Stoltz DA, Cavanaugh JE, Gerke AK, Welsh MJ, Zabner J, Polgreen PM. Cystic fibrosis carriers are at increased risk for a wide range of cystic fibrosis-related conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jan 21;117(3):1621-1627

205. Mok LC, Garcia-Uceda A, Cooper MN, Kemner-Van De Corput M, De Bruijne M, Feyaerts N, Rosenow T, De Boeck K, Stick S, Tiddens HAWM. The effect of CFTR modulators on structural lung disease in cystic fibrosis. *Front Pharmacol.* 2023 Apr 11;14:1147348

206. Montemayor K, Psoter KJ, Lechtzin N, Carson SW, Merlo CA, Dezube RH, Riekert KA, Allgood S, Toporek A, Jennings MT, West NE. Sex differences in treatment patterns in cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *J Cyst Fibros.* 2021 Nov;20(6):920-925

207. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):169-75

208. Mott LS, Park J, Murray CP, Gangell CL, de Klerk NH, Robinson PJ, Robertson CF, Ranganathan SC, Sly PD, Stick SM; AREST CF. Progression of early structural lung disease in young children with cystic fibrosis assessed using CT. *Thorax.* 2012 Jun;67(6):509-16

209. Mueller-Abt PR, Frawley KJ, Greer RM, Lewindon PJ. Comparison of ultrasound and biopsy findings in children with cystic fibrosis related liver disease. *J Cyst Fibros.* 2008 May;7(3):215-21

210. Munck A, Gérardin M, Alberti C, Ajzenman C, Lebourgeois M, Aigrain Y, Navarro J. Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *J Pediatr Surg.* 2006 Sep;41(9):1556-60

211. Munck A, Mayell SJ, Winters V, Shawcross A, Derichs N, Parad R, Barben J, Southern KW; ECFS Neonatal Screening Working Group. Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening. *J Cyst Fibros.* 2015 Nov;14(6):706-13

212. Nathanson MH, Burgstahler AD, Mennone A, Boyer JL. Characterization of cytosolic Ca2+ signaling in rat bile duct epithelia. *Am J Physiol.* 1996 Jul;271(1 Pt 1):G86-96

213. Navarro S. Recopilación histórica de la fibrosis quística. *Gastroenterol Hepatol.* 2016;39:36-42

214. Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008 Sep;11(5):613-9

215. Oliveira MC, Reis FJ, Monteiro AP, Penna FJ. Effect of meconium ileus on the clinical prognosis of patients with cystic fibrosis. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Jan;35(1):31-8

216. Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, Freedman SD, Zielenski J, Berthiaume Y, Corey M, Schibli S, Tullis E, Durie PR. Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2011 Jan;140(1):153-61

217. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009 May 30;373(9678):1891-1904

218. Padoan R, Cirilli N, Falchetti D, Cesana BM; Meconium Ileus Project Study Group. Risk factors for adverse outcome in infancy in meconium ileus cystic fibrosis infants: A multicentre Italian study. *J Cyst Fibros.* 2019 Nov;18(6):863-868

219. Parisi GF, Di Dio G, Franzonello C, Gennaro A, Rotolo N, Lionetti E, Leonardi S. Liver disease in cystic fibrosis: an update. *Hepat Mon.* 2013 Aug 14;13(8):e11215

220. Parikh NS, Ibrahim S, Ahlawat R. Meconium Ileus. [Updated 2023 Mar 8]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537008/

221. Parker-McGill K, Nugent M, Bersie R, Hoffman G, Rock M, Baker M, Farrell PM, Simpson P, Levy H. Changing incidence of cystic fibrosis in Wisconsin, USA. *Pediatr Pulmonol.* 2015 Nov;50(11):1065-1072

222. Parkins MD, Floto RA. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015; 14: 293–304

223. Patterson JM, Wall M, Berge J, Milla C. Gender differences in treatment adherence among youth with cystic fibrosis: development of a new questionnaire. *J Cyst Fibros.* 2008;7(2):154-164

224. Pavaut G, Kyheng M, Le Rouzic O, Perez T, Wallaert B, Prevotat A. Predictors of massive haemoptysis after a first episode of mild-to-moderate haemoptysis in patients with cystic fibrosis. *ERJ Open Res.* 2020;6(3):00382-2020

225. Pereira TN, Lewindon PJ, Smith JL, Murphy TL, Lincoln DJ, Shepherd RW, Ramm GA. Serum markers of hepatic fibrogenesis in cystic fibrosis liver disease. *J Hepatol.* 2004 Oct;41(4):576-83

226. Perlato A, Santandrea E, Della Libera C, Chelazzi L. Biases of attention in chronic smokers: men and women are not alike. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 2014;14(2):742-755

227. Petrova G, Yaneva N, Hrbková J, Libik M, Savov A, Macek M Jr. Identification of 99% of CFTR gene mutations in Bulgarian-, Bulgarian Turk-, and Roma cystic fibrosis patients. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(8):e696

228. Pozler O, Krajina A, Vanicek H, Hulek P, Zizka J, Michl A, Elias P. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in five children with cystic fibrosis: long-term results. *Hepatogastroenterology.* 2003 Jul-Aug;50(52):1111-4

229. Pradere JP, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 2010 Aug;30(3):232-44

230. Pranke I, Golec A, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Front Pharmacol.* 2019;10:121

231. Purushothaman AK, Nelson EJR. Role of innate immunity and systemic inflammation in cystic fibrosis disease progression. *Heliyon.* 2023 Jun 29;9(7):e17553

232. Quinton PM. Role of epithelial HCO3– transport in mucin secretion: lessons from cystic fi brosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 299: C1222–33

233. Quon BS, Rowe SM. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ.* 2016 Mar 30;352:i859

234. Rabeh WM, Bossard F, Xu H, Okiyoneda T, Bagdany M, Mulvihill CM, Du K, di Bernardo S, Liu Y, Konermann L, Roldan A, Lukacs GL. Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore ΔF508 CFTR folding and function. *Cell.* 2012 Jan 20;148(1-2):150-63

235. Ragan H, Autry E, Bomersback T, Hewlett J, Kormelink L, Safirstein J, Shanley L, Lubsch L. The use of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in patients with cystic fibrosis postliver transplant: A case series. *Pediatr Pulmonol.* 2022 Feb;57(2):411-417

236. Ramsey BW, Banks-Schlegel S, Accurso FJ, Boucher RC, Cutting GR, Engelhardt JF, Guggino WB, Karp CL, Knowles MR, Kolls JK, LiPuma JJ, Lynch S, McCray PB Jr, Rubenstein RC, Singh PK, Sorscher E, Welsh M. Future directions in early cystic fibrosis lung disease research: an NHLBI workshop report. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Apr 15;185(8):887-92

237. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 2011 Nov 3;365(18):1663-72

238. Ramsey ML, Wellner MR, Porter K, Kirkby SE, Li SS, Lara LF, Kelly SG, Hanje AJ, Sobotka LA. Cystic fibrosis patients on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators have a reduced incidence of cirrhosis. *World J Hepatol.* 2022 Feb 27;14(2):411-419

239. Rauch S, Litvak A, Steiner M. Congenital familial steatorrhea with fibromatosis of the pancreas and bronchiectasis. *J. Pediat.* 1939;14:462-490

240. Reasoner SA, Enriquez KT, Abelson B, Scaglione S, Schneier B, O'Connor MG, Van Horn G, Hadjifrangiskou M. Urinary tract infections in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2022 Jan;21(1):e1-e4

241. Ren CL, Borowitz DS, Gonska T, Howenstine MS, Levy H, Massie J, Milla C, Munck A, Southern KW. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Metabolic Syndrome and Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis. *J Pediatr.* 2017 Feb;181S:S45-S51.e1

242. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1066-73

243. Robinson NJ, Bukteel A, McCabe D, Miller D, Gray RD, WS02.03 Investigating changes in liver function tests across the first year of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor therapy, presented at ECFS Conference 2022, Rotherdam

244. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1059-65

245. Rowe SM, Daines C, Ringshausen FC, Kerem E, Wilson J, Tullis E, Nair N, Simard C, Han L, Ingenito EP, McKee C, Lekstrom-Himes J, Davies JC. Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med.* 2017 Nov 23;377(21):2024-2035

246. Rowe SM, Verkman AS. Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Jul 1;3(7):a009761

247. Rowland M, Gallagher C, Gallagher CG, Laoide RÓ, Canny G, Broderick AM, Drummond J, Greally P, Slattery D, Daly L, McElvaney NG, Bourke B. Outcome in patients with cystic fibrosis liver disease. *J Cyst Fibros.* 2015 Jan;14(1):120-6

248. Ruddy RM, Scanlin TF. Abnormal sweat electrolytes in a case of celiac disease and a case of psychosocial failure to thrive. Review of other reported causes. *Clin Pediatr (Phila).* 1987 Feb;26(2):83–9

249. Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fi brosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186: 857–65

250. Saiman L, Chen Y, San Gabriel P, Knirsch C. Synergistic activities of macrolide antibiotics against Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, Alcaligenes xylosoxidans isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1105-1107

251. Sakhuja S, Staples HM, Minard CG, Ramm LE, Lewindon PJ, Ramm GA, Leung DH. Risk factors for more rapid progression of severe liver fibrosis in children with cystic fibrosis-related liver disease: A multi-center study validated by liver biopsy. *Liver Int.* 2023 Jun;43(6):1277-1286

252. Sathe M, Houwen R. Meconium ileus in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2017 Nov;16 Suppl 2:S32-S39

253. Savić N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res.* 2016 Feb;168:15-21

254. Schiaffini R, Pampanini V. Diabetes and prediabetes in children with cystic fibrosis. *Curr Opin Pediatr.* 2023 Aug 1;35(4):481-485

255. Schwartz M, Brandt NJ, Koch C, Lanng S, Schiøtz PO. Genetic analysis of cystic fibrosis in Denmark. Implications for genetic counselling, carrier diagnosis and prenatal diagnosis. *Acta Paediatr.* 1992 Jun-Jul;81(6-7):522-6

256. Scotet V, Duguépéroux I, Saliou P, Rault G, Roussey M, Audrézet MP, Férec C. Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Mar 1;7:14

257. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn screening for CF across the globe – Where is it worthwhile? *Int. J. Neonatal Screen.* 2020;6:18

258. Scotet V, L'Hostis C, Férec C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the *CFTR* Gene Discovery. *Genes (Basel).* 2020;11(6):589

259. Scott J, Jones AM, Piper Hanley K, Athwal VS. Review article: epidemiology, pathogenesis and management of liver disease in adults with cystic fibrosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2022 Feb;55(4):389-400

260. Sergeev V, Chou FY, Lam GY, Hamilton CM, Wilcox PG, Quon BS. The Extrapulmonary Effects of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators in Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2020 Feb;17(2):147-154

261. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2021; 397(10290), 2195–2211

262. Siegenthaler P, Dehaller R, Dubach UC. Salt excretion in sweat in cystic fibrosis. *JAMA*. 1963; 186: 1178.

263. Simmonds NJ, Cullinan P, Hodson ME. Growing old with cystic fibrosis—the characteristics of long-term survivors of cystic fibrosis. *Respir Med.* 2009; 103: 629–35

264. Sly PD, Gangell CL, Chen L, Ware RS, Ranganathan S, Mott LS, Murray CP, Stick SM; AREST CF Investigators. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2013 May 23;368(21):1963-70

265. Sokol RJ, Durie PR. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group. Recommendations for Management of Liver and Biliary Tract Disease in Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999; 28 Suppl 1:S1-S13

266. Soltman S, Hicks RA, Naz Khan F, Kelly A. Body composition in individuals with cystic fibrosis. *J Clin Transl Endocrinol.* 2021 Oct 30;26:100272

267. Sommerburg O, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kohlmueller D, Happich M, Kulozik AE, Stopsack M, Gahr M, Hoffmann GF, Mall MA. Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany. *Pediatr Pulmonol.* 2015 Jul;50(7):655-64

268. Sontag MK, Miller JI, McKasson S, Gaviglio A, Martiniano SL, West R, Vazquez M, Ren CL, Farrell PM, McColley SA, Kellar-Guenther Y. Newborn Screening for Cystic Fibrosis: A Qualitative Study of Successes and Challenges from Universal Screening in the United States. *Int J Neonatal Screen.* 2022 Jun 23;8(3):38

269. Sontag ML, Wagener JS, Accurso F, Sager SD. Consistent incidence of cystic fibrosis in a long-term newborn screen population. In Proceedings of the 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference Meeting, Orlando, FL, USA, 23–26 October 2008

270. Sosnay PR, White TB, Farrell PM, Ren CL, Derichs N, Howenstine MS, Nick JA, De Boeck K. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations. J Pediatr. 2017 Feb;181S:S52-S57.e2

271. Southern KW, Barben J, Gartner S, Munck A, Castellani C, Mayell SJ, Davies JC, Winters V, Murphy J, Salinas D, McColley SA, Ren CL, Farrell PM. Inconclusive diagnosis after a positive newborn bloodspot screening result for cystic fibrosis; clarification of the harmonised international definition. *J Cyst Fibros.* 2019 Nov;18(6):778-780

272. Southern KW, Patel S, Sinha IP, Nevitt SJ. Correctors (specific therapies for class II CFTR mutations) for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;8(8):CD010966

273. Staufer K. Current Treatment Options for Cystic Fibrosis-Related Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 14;21(22):8586

274. Staufer K, Halilbasic E, Trauner M, Kazemi-Shirazi L. Cystic fibrosis related liver disease--another black box in hepatology. *Int J Mol Sci.* 2014 Aug 4;15(8):13529-49.

275. Stephenson AL, Stanojevic S, Sykes J, Burgel PR. The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017, 46, e87–e95

276. Sterneckert JL, Reinhardt P, Scholer HR. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet.* 2014;15:625–639

277. Stick SM, Brennan S, Murray C, Douglas T, von Ungern-Sternberg BS, Garratt LW, Gangell CL, De Klerk N, Linnane B, Ranganathan S, Robinson P, Robertson C, Sly PD; Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST CF). Bronchiectasis in infants and preschool children diagnosed with cystic fibrosis after newborn screening. *J Pediatr.* 2009 Nov;155(5):623-8.e1

278. Stonebreaker JR, Ooi CY, Pace RG, Corvol H, Knowles MR,Durie PR, Ling SC Features of Severe Liver Disease With Portal Hypertension in Patients With Cystic Fibrosis, *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2016;14:1207–1215

279. Strazzabosco M. and Fabris L. Functional anatomy of normal bile ducts. *Anat Rec.* 2008;291:653–60

280. Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C. Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39:S90–102

281. Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009, 373, 1891–1904

282. Tanriverdi S, Polat M, Onay H. Determination of Cystic Fibrosis Mutation Frequency in Preterm and Term Neonates with Respiratory Tract Problems. *Balkan J Med Genet.* 2022;24(2):25-31

283. Terlizzi V, Dolce D. Variability of the sweat test in children with Cystic Fibrosis previously CRMS/CFSPID: A retrospective monocenter experience. *J Cyst Fibros.* 2023;22(3):496-498

284. Thavamani A, Umapathi KK, Kutney K, Sferra TJ, Sankararaman S. Cystic fibrosis-related liver disease is an independent risk factor for mortality and increased health care resource utilization in hospitalized pediatric patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2022 Jul;57(7):1717-1725

285. Thibodeau PH, Richardson JM 3rd, Wang W, Millen L, Watson J, Mendoza JL, Du K, Fischman S, Senderowitz H, Lukacs GL, Kirk K, Thomas PJ. The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem.* 2010 Nov 12;285(46):35825-35

286. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science.* 1985 Nov 29;230(4729):1054-7

287. Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, Drain M, Klem ER, Cardwell C, Ennis M, Boucher RC, Wolfgang MC, Elborn JS. Lung microbiota and bacterial

abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation. Am J Respir Crit Care Med. 2013 May 15;187(10):1118-26

288. Turck D, Braegger CP, Colombo C, Declercq D, Morton A, Pancheva R, Robberecht E, Stern M, Strandvik B, Wolfe S, Schneider SM, Wilschanski M. ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. *Clin Nutr.* 2016 Jun;35(3):557-77

289. Van Mourik IDM. Liver disease in cystic fibrosis. *Paediatrics and Child Health.* 2017; 27 (12); 552-555

290. Vardar BU, Dupuis CS, Goldstein AJ, Vardar Z, Kim YH. Ultrasonographic evaluation of patients with abnormal liver function tests in the emergency department. Ultrasonography. 2022 Apr;41(2):243-262

291. Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, Skach WR, Cutting GR, Frizzell RA, Sheppard DN, Cyr DM, Sorscher EJ, Brodsky JL, Lukacs GL. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell.* 2016 Feb 1;27(3):424-33

292. Vidaillac C, Yong VFL, Jaggi TK, Soh MM, Chotirmall SH. Gender differences in bronchiectasis: a real issue? *Breathe (Sheff).* 2018 Jun;14(2):108-121

293. Wasuwanich P, Karnsakul W. Cystic fibrosis-associated liver disease in children. *Minerva Pediatr.* 2020 Oct;72(5):440-447

294. Waters V, Smyth A. Cystic fibrosis microbiology: advances in antimicrobial therapy. *J Cyst Fibros.* 2015; 14: 551–60

295. Weiss L, Reix P, Mosnier-Pudar H, Ronsin O, Beltrand J, Reynaud Q, Mely L, Burgel PR, Stremler N, Rakotoarisoa L, Galderisi A, Perge K, Bendelac N, Abely M, Kessler L. Screening strategies for glucose tolerance abnormalities and diabetes in people with cystic fibrosis. *Diabetes Metab.* 2023 May;49(3):101444

296. Welsh M, Ramsey BW, Accurso FJ, Cutting GR. Cystic fibrosis. In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th ed.; Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, Eds.; McGraw Hill: New York, NY, USA, 2001; pp. 5121–5188

297. Wilcken B. Community-wide screening for cystic fibrosis carriers could replace newborn screening for the diagnosis of cystic fibrosis. *J Paediatr Child Health.* 2008;44(4):232-233

298. Williams SG, Evanson JE, Barrett N, Hodson ME, Boultbee JE, Westaby D. An ultrasound scoring system for the diagnosis of liver disease in cystic fibrosis. *J Hepatol.* 1995;22:513–21

299. Wilschanski M, Novak I. The cystic fibrosis of exocrine pancreas. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3: a009746.

300. Wilschanski M, Rivlin J, Cohen S, Augarten A, Blau H, Aviram M, Bentur L, Springer C, Vila Y, Branski D, Kerem B, Kerem E. Clinical and genetic risk factors for cystic fibrosis-related liver disease. *Pediatrics.* 1999 Jan;103(1):52-7

301. Witters P, Libbrecht L, Roskams T, De Boeck K, Dupont L, Proesmans M, Vermeulen F, Maleux G, Monbaliu D, Pirenne J, Cassiman D. Liver disease in cystic fibrosis presents as non-cirrhotic portal hypertension. *J Cyst Fibros.* 2017 Sep;16(5):e11-e13

302. Woodruff SA, Sontag MK, Accurso FJ, Sokol RJ, Narkewicz MR. Prevalence of elevated liver enzymes in children with cystic fibrosis diagnosed by newborn screen. *J Cyst Fibros.* 2017 Jan;16(1):139-145

303. Wu H, Vu M, Dhingra S, Ackah R, Goss JA, Rana A, Quintanilla N, Patel K, Leung DH. Obliterative Portal Venopathy Without Cirrhosis Is Prevalent in Pediatric Cystic Fibrosis Liver Disease With Portal Hypertension. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019 Sep;17(10):2134-2136

304. Zampoli M, Morrow BM, Paul G. Real-world disparities and ethical considerations with access to CFTR modulator drugs: Mind the gap! *Front Pharmacol.* 2023 Mar 27;14:1163391

305. Zhang Z, Liu F, Chen J. Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018 Dec 11;115(50):12757-12762

306. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.* 2000;67(2):117-33

307. Zybert K, Mierzejewska E, Sands D. Clinical status and somatic development of patients with or without meconium ileus diagnosed through neonatal screening for cystic fibrosis. *Dev Period Med.* 2015 Jan-Mar;19(1):41-9