МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

КЛИНИКА ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ И БОЛЕСТИ НА ОБМЯНАТА

УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“

Д-р Вера Начева Карамфилова

Нови биохимични и генетични маркери при неалкохолна стеатозна болест със затлъстяване и предиабет

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Научни ръководители: Проф. Здравко Асенов Каменов, д.м., д.м.н.

Проф. Людмила Матева Владимирова, д.м., д.м.н.

София

2019

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

КЛИНИКА ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ И БОЛЕСТИ НА ОБМЯНАТА

УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“

Д-р Вера Начева Карамфилова

Нови биохимични и генетични маркери при неалкохолна стеатозна болест със затлъстяване и предиабет

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление 7.1. Медицина. Научна специалност „Вътрешни болести“

Научни ръководители: Проф. Здравко Асенов Каменов, д.м., д.м.н.

Проф. Людмила Матева Владимирова, д.м., д.м.н.

София, 2019

Дисертационният труд е представен на 170 стандартни печатни страници, онагледен с 23 фигури и 52 таблици. В библиографията са включени 353 заглавия, от които 18 на кирилица и 335 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са реализирани общо 6 публикации, 4 от които са с импакт фактор и 4 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедра по вътрешни болести на Медицински факултет с извлечение от протокол № 5/03.12.2019г. и е насочен за защита пред научно жури в състав:

1. проф. Красимир Антонов Антонов, дмн - МУ- София
2. доц. д-р Атанаска Петрова Еленкова, дм - МУ- София
3. проф. д-р Жулиета Борисова Геренова, дмн - МУ-Стара Загора
4. проф. д-р Ивона Кирилова Даскалова, дмн - СУ- София
5. доц. Мариета Йорданова Симонова, дм - СУ- София

Резервни членове:

1. проф. д-р Зоя Ангелова Спасова, дм - МУ- София
2. доц. Катя Николова Тодорова, дм - МУ - Плевен

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури, назначено от Ректора на Медицински Университет – София на 27.02.2020 г. от 14.00 часа в аудитория „Проф. Константин Чилов“.

Съдържание

Въведение……7

Цели и задачи……..9

Материали и методи……..11

Резултати……23

Обсъждане…… 49

Изводи……78

Справка за приносите……....80

Публикации по темата на дисертацията……..84

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АЛТ – аланин-аминотрансфераза

АСТ - аспартат-аминотрансфераза

АХ – артериална хипертония

ГГТ – гама-глутамил-транспептидаза

ДАГ- диацилглицерол

ДАН – диастолно артериално налягане

ЕПР –ендоплазматичен ретикулум

ЗД2 – захарен диабет тип 2

ИР – инсулинова резистентност

ИТМ – индекс на телесна маса

КЗ – кръвна захар

МС – метаболитен синдром

НАСБ – неалкохолна стеатозна болест

НАСХ – неалкохолен стеатозен хепатит

НГГ – нарушена гликемия на гладно

НГТ – нарушен глюкозен толеранс

ОГТТ – орален глюкозотолерансен тест

ОХ – общ холестерол

САН – систолно артериално налягане

СМК – свободни мастни киселини

ССЗ –сърдечно-съдово заболяване

ТАГ- триацилглицерол

ТГ – триглицериди

ABI - Ankle-Brachial Index, индекс глезен/мишница

APRI - AST to Platelet Ratio Index, индекс АСТ/тромбоцити

ARGF – Ангиопоетин свързан растежен фактор

EASD - European Association for the Study of Diabetes

EASL - European Association for the Study of the Liver

EASO- European Association for the Study of Obesity

ELF - Enhanced Liver Fibrosis

HDL – липопротиени с висока плътност

HOMA-IR - Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance

IMT – Intima Media Thickness, интима медиа дебелина

FGF 21 - Фибробластен растежен фактор 21

FIB-4- Фиброза стадиий -4

LDL - Липопротеини с ниска плътност

NDS - Neuropathy disability score, индекс за невропатия

NFS - NAFLD fibrosis scor

PNPLA3 – Patatin-like phospholipase domain-containg protein 3

PTX3 – Пентраксин 3

RBP4 - Ретинол свързващ протеин 4

SHBG – Секс- хормон свързващ глобулин

TM6SF2- Transmembrane 6 Superfamily Member 2

VAI - visceral adiposity index; индекс за висцерално затлъстяване

VLDL – липопротеини с много ниска плътност

WHR - Waist-to-hip ratio - Отношението талия/ханш

WSR - Waist-to-stature ratio - Отношение талия/ръст

WISP- 2 - Wnt1-inducible signaling pathway protein-2

Въведение

Неалкохолната стеатозна болест (НАСБ) е най-честото чернодробно заболяване в световен мащаб. Честотата й нараства успоредно с увеличаването на затлъстяването и метаболитния синдром (МС). НАСБ е пряко свързана с инсулиновата резистентност. Включва широк спектър от различни по тежест чернодробни промени, формиращи континиума на НАСБ: неалкохолна стеатоза (НАС), неалкохолен стеатозен хепатит (НАСХ) с или без фиброза, цироза и хепатоцелуларен карцином. С НАСБ се асоциира и континиума на захарния диабет тип 2 (ЗД2): генетична предиспозиция, епигенетични фактори, затлъстяване и МС, предиабет, диабет, усложнения на диабета и повишен сърдечно-съдов риск. Клиничната изява, тежестта и естествената еволюция/прогресия на НАСБ са различни и зависят от редица фактори от околната среда и генетичната предиспозиция. Лицата с НАСБ са с намалена преживяемост, като смъртността е свързана както с усложненията на чернодробната цироза и хепатоцеуларния карцином, така и със ССЗ или появата на неоплазми. Различни неинвазивни сурогатни маркери, включително генетични, за предсказване на фиброзата и нейната степен, риска от прогресия до цироза, хепатоцелуларен карцином или тежки метаболитни нарушения се изследват усилено с цел профилактика, мониториране и лечение. Въпреки това, до този момент доказателствата за приложението им в рутинната практика са малко. Препоръчват се по-нататъшни проучвания.

Разбирането на връзката между НАСБ, затлъстяването, нарушенията във въглехидратната обмяна и ССЗ ще допринесе за разработване на по-ефективни стратегии за ранно откриване и лечение както на НАСБ, така и на предиабета и неговите усложнения. Отношенията на разгърнатата НАСБ/НАСХ и ЗД2 са добре проучени. Налагащата се в съвременната медицина тенденция към все по-ранна интервенция с оглед възможности за

превенция предполага изучаване на тези болести в най-ранните им клинични етапи – неалкохолната стеатоза и предиабета. Данните в литературата за връзката между тези ранни етапи са изключително малко.

Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да се оцени значението на някои нови биохимични и генетични маркери при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет.

За постигане на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Да се оцени връзката на НАСБ и някои нови хепатокини, адипокини и екстрацелуларни матриксни протеини с метаболитните промени при пациенти със затлъстяване, с и без предиабет и да се установят прагови стойности на най-значимите биомаркери за разграничаване на лицата с НАСБ с и без предиабет:

   Ретинол свързващ протеин 4 (RBP4), Хемерин, Лумикан, Фибробластен растежен фатор 21 (FGF21), Wnt1-inducible signaling pathway protein-2 (WISP 2), Пентраксин 3 (PTX3), Ангиопоетин свързан растежен фактор (AGF), Фетуин А, Секс хормон свързващ глобулин (SHBG).
2. Да се оцени честотата на някои генетични полиморфизми свързани с НАСБ и връзката им с метаболитните промени при пациенти със затлъстяване с и без предиабет: Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) rs738409 (I148M) вариант и на Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) rs58542926 (TM6SF2) вариант.
3. Да се оцени връзката между утвърдени скорови системи за фиброза при НАСБ с изследваните биомаркери.
4. Да се изследват някои показатели за микро– и макроангиопатия при пациенти с НАСБ, затлъстяване с и без предиабет и да се оцени връзката им с изследваните нови биохимични и генетични маркери.

5. Да се изведе алгоритъм на базата на изследваните биомаркери с цел ранна диагноза, профилактика и лечение на метаболитните отклонения при НАСБ, затлъстяване и предиабет.

Материали и методи

Изследвани лица

В проучването бяха включени общо 297 лица на средна възраст 50,2±10,8 изследвани в Клиниката по Ендокринология и болести на обмяната към УМБАЛ „Александровска“, МУ-София за периода 2017-2019 г., разпределени в следните основни групи:

1. Група 1 - НАСБ със затлъстяване без въглехидратни нарушения – общо 176 пациенти
2. Група 2 – НАСБ със затлъстяване и предиабет – общо 121 пациенити

Включващи критерии:

- Възраст ≥18 г.
- Затлъстяване (ИТМ ≥ 30 kg/m^2; и/или талия > 94 cm за мъжете и > 80cm за жените)
- Нарушена гликемия на гладно (НГГ- плазмена глюкоза на гладно равна или по-висока от 5.6 mmol/l и по-ниска от 7.0 mmol/l) и/или нарушен въглехидратен толеранс (НВТ - плазмена глюкоза на 2-я час след орално обременяване с глюкоза равна или по-висока от 7.8 mmol/l, но по-ниска от 11.1 mmol/l), HbA1c < 6,5% и ≥ 5,7%
- Ехографски базирана диагноза първична неалкохолна стеатозна болест
- Подписано информирано съгласие

Изключващи критерии:

- Алкохолна болест на черния дроб; консумация на алкохол > 20 g дневно абсолютен алкохол за жените и >30 g за мъжете

- Вторична неалкохолна стеатозна болест (хепатит С, прием на стеатогенни медикаменти – амиодарон, метотрексат, тамоксифен, кортикостероиди, вродени метаболитни заболявания)
- Напреднала фиброза и цироза на база ELF тест, NFS, APRI и FIB-4
- Захарен диабет (кръвна захар на гладно ≥ 7.0 mmol/l и/или случайна или на 2 час след ОГТТ ≥ 11.1 mmol/l и/или HвA1c ≥ 6.5%).
- Неопластични заболявания
- Хронично бъбречно заболяване с eGFR < 60 ml/min/1.73 m^2 (изчислена по CKD-EPI формула)
- Сърдечна недостатъчност III-IV клас по NYHA
- Друго ендокринно заболяване (като Синдром на Кушинг, акромегалия, хипер- и хипотиреоидизъм и др.)
- Други придружаващи заболявания, които биха се отразили на получените резултати

Методи

Проведени бяха следните изследвания**:**

А) Анамнеза и физикално изследване

Б) Антропометрични изследвания

- Ръст (см), тегло (кг)
- Индекс на телесна маса - ИТМ кг/$м^2$ (теглото в килограми, разделено на ръста в метри на квадрат)
- Обиколка на талията (waist circumference - WC), измерена по средата на разстоянието между ребрената дъга и илиачния гребен
- Обиколка на ханша (hip circumference - HC), измерена на нивото на големия трохантер

- Отношението талия/ханш (waist-to-hip ratio - WHR)
- Отношение талия/ръст (waist-to-stature ratio - WSR)
- Телесен състав - оценен чрез биоимпедансен анализ (Tanita, BC408, Япония) – индекс на телесната маса (BMI), мастна маса (Fat mass), процент мастна тъкан (Fat %), свободна от мазнини маса (Fat free mass).
- VAI (visceral adiposity index; индекс за висцерално затлъстяване) - изчислен по следните формули:

  За жени: VAI = (WC 36.58 + (1.89 × BMI)) × (TG/ 0.81)×(1.52/ HDL)

  За мъже: VAI = (WC 39.68 + (1.88 × BMI)) × (TG /1.03)×(1.31/ HDL)

За нормални стойности се приема индекс < 1, между 1 и 2 – сива зона и > 2 – за повишен кардиометаболитен риск свързан с дисфункция на мастната тъкан

В) Стандартни лабораторни изследвания,

проведени сутрин на гладно (без прием на храна в продължение най-малко на 12 часа преди изследването). Те включваха: хематологични показатели – хемоглобин, хематокрит, еритроцити, левкоцити, тромбоцити, MCV, MCH, MCHC, MPV, СУЕ; стандартни биохимични параметри, вкл. пикочна киселина, албумин, липиди - ОХ, HDL, LDL, ТГ, АСТ, АЛТ, ГГТ, креатинин, eGFR; общо изследване на урина. Изследванията са проведени в Централна Клинична лаборатория на УМБАЛ „Александровска“, която е референтна за България

Г) ЕКГ – 12 канален запис със стандартни критерии за оценка

Д) Абдоминална ехография, проведена от специалисти по гастроентерология в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ “Св. Иван Рилски” с апарат Aloka Pro Sound F75 Premier.

Е) Основни дефиниции и диагностични методи

Диагнозата първична НАСБ бе поставена според препоръките на Българското дружество по гастроентерология, гастроинтестинална ендоскопия и абдоминална ехография от 2010 г., и тези на Европейската асоциация за изучаване на черния дроб, Европейската асоциация за изучаване на диабета и Европейската асоциация за изучаване на затлъстяването от 2016 г. НАСБ бе приета при ехографски данни за стеатоза у лица, които консумират абсолютен алкохол до 30 g/дн за мъжете и 20 g/дн за жените, при изключена друга причина за чернодробно заболяване.

Изчисленията за *дневната консумация на абсолютен алкохол* са направени на базата на преизчисляване през 1 стандартна алкохолна единица, която се равнява на около 10-14 g абсолютен алкохол по формулата: 1 алкохолна единица = количеството алкохол (ml) х концентрацията (%)/ 1000. Последният се съдържа в 30-45 ml концентрирана алкохолна напитка (уиски, водка, ракия), 100-120 ml вино или 250 ml бира.

Затлъстяване е прието при ИТМ >30 (kg)/m^2 (по Класификацията на СЗО) и/или талия > 94 cm за мъжете и > 80cm за жените (по класификацията на IDF за метаболитен синдром, 2009)

За оценка на *промените в глюкозата и инсулина* използвахме следните методи и критерии:

- Стандартен ОГТТ със 75 g глюкоза, с изследване на глюкозата на 0-ва, на 60-та и 120-та минута от обременяването.
- Серумен инсулин (на гладно, и по време на ОГТТ) – чрез електрохемилуминисцентен метод (ECLIA) проведен в Централна Клинична лаборатория на УМБАЛ “Александровска“

Нормална гликемия на гладно/нормален глюкозен толеранс: Плазмена глюкоза на гладно по-ниска или равна на 5.6 mmol/l - „нормална гликемия

на гладно” и плазмена глюкоза на 2-я час след орално обременяване с глюкоза - по-ниска от 7.8 mmol/l -„нормален глюкозен толеранс” .

Предиабет се приемаше по критериите на ADA (предвид и на използването на IDF дефиницията на МС) и включва *Нарушена гликемия на гладно и/или нарушен глюкозен толеранс:* Плазмена глюкоза на гладно равна или по-висока от 5.6 mmol/l и по-ниска от 7.0 mmol/l - „нарушена гликемия на гладно” (НГГ) или плазмена глюкоза на 2-я час след орално обременяване с глюкоза равна или по-висока от 7.8 mmol/l, но по-ниска от 11.1 mmol/l - „нарушен глюкозен толеранс” (НГТ); HbA1c < 6,5% и ≥ 5,7%.

За оценка на *инсулиновата резистентност и чувствителност* използвахме следните сурогатни маркери:

- HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance), изчислен от стойностите на глюкозата (mmol/l) и инсулина (mU/l), измерени на гладно по следната формула - HOMA-IR = Инсулин на гладно x глюкоза/22.5. Инсулинова резистентност приехме при стойности на HOMA-IR ≥ 2,5.
- Индекси за инсулинова чувствителност - *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* [QUICKI Index = 1/log (кръвна захар на гладно (mmol/l)) + log (инсулин на гладно (mU/l)], *Stumvoll index* за инсулинова чувствителност [ISI Stumvoll, базиран на плазмена глюкоза (mmol/l) и инсулин (mU/l) по време на ОГТТ с или без демографски параметри ИТМ, възраст. *Bennett index* = 1/ ln (кръвна захар на гладно (mmol/l) x ln (инсулин 0 min (mU/l).

За поставяне на диагнозата *метаболитен синдром* използвахме критериите от *International Diabetes Federation (IDF), the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), the World Heart Federation (WHF), the International Atheroschlerosis Society (IAS), and the American Heart Association (AHA), 2009.* Според тези критерии диагнозата МС се приема при наличието на поне 3 от следните 5 критерия:

1. Абдоминално затлъстяване (обиколка на талията ≥ 94 см за мъже и ≥ 80 см за жени)

2. Повишени триглицериди (> 1.7 mmol/l)

3. Намален HDL – холестерол (< 1.0 mmol/l за мъже и < 1.3 mmol/l за жените) или провеждано лечение за дислипидемия

4. Артериално налягане > 130 mm Hg за систолното или >85 mm Hg за диастолното, или прием на антихипертензивни медикаменти за лечение на артериална хипертоония

5. Плазмена глюкоза на гладно > 5.6.mmol/l или лечение на ЗД 2

Дислипидемия приехме при LDL ≥ 3,2 mmol/l и/или HDL ≤ 1,3 mmol/l за жените и ≤ 1,03 mmol/l за мъжете и/или триглицериди ≥ 1,7 mmol/l и/или провеждано лечение със статин, фибрат или друг медикамент.

Ж) Други специализирани изследвания:

Неинвазивната оценка на чернодробна фиброза за отхвърляне на напреднала фиброза (F3-F4) **в**ключваше изчисляване на следните скорове:

- *APRI скор* (AST to **P**latelet **R**atio **I**ndex - APRI), изчислен с калкулатор по следната формула:

  $$\text{APRI} = \frac{\text{AST level (/ULN)}}{\text{Platelet count } (10^9/\text{L})} \text{ X } 100$$

  ULN = Upper Limit of Normal

  Стойности < 0.5 отхвърлят наличие на фиброза; > 0.7 - предполагат напреднала фиброза (F3 - F4), а > 1 (APRI 1) скор - цироза (F4). Последната е по-сигурна при APRI скор > 2, но с по-ниска специфичност.

- *Фиброза стадий 4 (FIB-4)* бе изчислен с калкулатор на база стойностите на възраст, АСТ, АЛТ и тромбоцити по следната формула: FIB-4 = (Age x AST) / (Platelets x (√ (ALT). FIB-4 < 1.30

отхвърля напреднала фиброза (F3-F4), FIB-4 между 1.30 и 2.67 – сива зона, а FIB-4 > 2.67 предсказва напреднала фиброза (F3 – F4).

- *NFS (NAFLD fibrosis score)* бе изчислен също с калкулатор на база стойностите възраст, ИТМ, НВТ или ЗД2, АСТ, АЛТ, тромбоцити и албумин. NFS < -1.455 – отхвърля сигнификантна фиброза (F0-F2), NFS между ≤ -1.455 и ≤ 0.675 – сива зона, NFS >0.675 - предиктор за наличие на сигнификантна фиброза (F3-F4).
- *ELF - тестът* на ADVIA Centaur® Enhanced Liver Fibrosis (ELF) е диагностика *in vitro* за мултивариантен индекс, предназначен да даде резултат чрез комбиниране в алгоритъм количествените измервания на хиалуронова киселина (HA), амино-терминален пропептид от тип III проколаген (PIIINP) и тъканния инхибитор на металопротеиназа 1 (TIMP-1) в човешки серум.

  Тестът ADVIA Centaur ELF определя количествено анализите, които са директни маркери за чернодробна фиброза. PIIINP е маркер за ранна фиброгенеза и възпаление, TIMP-1 е циркулиращият инхибитор на MMP ензими, които могат да повишат фиброгенезата и HA е гликозаминогликан, който се произвежда от звездовидните клетки в черния дроб. Заедно тези анализи измерват качествените и количествените промени в екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ). ЕЦМ се отнася до набор от макромолекули, които изграждат извънклетъчно скелета на черния дроб. Някои ЕЦМ маркери отразяват фиброгенезата, а други отразяват регресия на фиброзата, позволяваща динамична оценка на активността на ЕЦМ. ELF резултатът, получен от алгоритъм, който комбинира индивидуалните резултати за HA, PIIINP и TIMP-1, могат да бъдат полезни за оценка на риска за чернодробна фиброза при пациенти, които са били диагностицирана с хронично чернодробно заболяване. Материал – серум REF 10492342q 2019-05-14. Изследването е напарвено с ADVIA Centaur CP system, Siemens, Germany в Клинична

лаборатория на УМБАЛ “Св. Иван Рилски“. Стойности под 7.7 – изключват фиброза, между 7.7 и 9.8 се прогнозира умерена фиброза, а над 11.3 – цироза.

- Индекс за чернодробна стеатоза (Hepatic steatosis index (HSI) = 8 × (ALT/AST ratio) + BMI (+2, if female; +2, if diabetes mellitus) . HSI е лесен и ефикасен скринингов инструмент за НАСБ, който може да се използва за избор на индивиди за ехография на черния дроб и за определяне на необходимостта от модификации на начина на живот. При стойности <30.0 или >36.0, HSI изключва НАСБ с чувствителност 93.1%, или открива НАСБ със специфичност съответно 92.4%.

Специализирани инструменталните изследвания, проведени в Клиниката по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Александровска“ за оценка на субклинична атеросклероза и полиневропатия:

- Измерване на интима медиа дебелина на a. carotis com. (IMT). Измерването на IMT е неинвазивен ултразвуков биомаркер за ранна атеросклероза. Системата Cardio Health Station (Panasonic, Japan) извършва автоматизирана оценка на IMT, вземайки предвид данните на индивидуалния пациент, като прави комбинирана оценка между данните от ехографското изследване и Frammingham risk score (традиционен сурогатен скор за оценка на сърдечно-съдовия риск). Методът е одобрен от американската Food and Drug Administration (FDA).

- Изследване за судомоторна дисфункция и като показател на автономната нервна система с апарат SudoScan (Impeto Medical, Paris, France). SudoScan е нов метод за бърза, неинвазивна оценка и количествено измерване на судомоторната функция. За извършване на оценката на судомоторната функция се поставят нисковолтажни

електроди на ръцете и краката на пациента с цел – екстракция на хлорните йони от потта. Това води до протичане на електрохимична реакция между потта и електродите. Електрохимичната потна проводимост е директно зависима от способността на потните жлези да транспортират хлорни йони и рефлектира пряко състоянието на С-влакната, оценено чрез кожна биопсия. По този начин се изчислява и риска от автономна невропатия. Методът е с добра репродуктивност –до 5-10% разлика между две последователни измервания и не се влияе от състоянието на гликемията.

- Изчисляване на индекса глезен/мишница *(Ankle-Brachial Index – ABI).* ABI представлява отношението между систолното налягне на глезена и брахиалното систолно налягане и дава информация за наличието на периферна артериална болест. Стандартен маншон се поставят на мишницата и до глезена за измерване на артериалното налягане в легнало положение. Систоличното налягане на долните крайници се отчита с доплер-инструмент. Стойността на ниво глезен се разделя на тази на ниво мишница, като нормално стойностите варират от 0,95 до 1,2. При стойности над 0,80 клиничните оплаквания обикновено са минимални. При индекс между 0,80 и 0,40 е налице изразена исхемия и болка. При индекс под 0,40 е налице болезнена критична исхемия.

- Изследване за наличие на периферна невропатия – оценка на тактилен (с помощта на 10g монофиламент), температурен (с помощта на термален дискриминатор) и вибрационен усет (с помощта на 128Hz камертон и биотезиометър) и сухожилно-надкостни рефлекси (с помощта на неврологично чукче) и изчисляване на риска за периферна невропатия (Neuropathy disability score - NDS). Изследване на вибрационната чувствителност с биотезиометър (Vibration Perception Threshold (VPT) с Ultra

Biotesiometer Meteda, USA). Нормална вибрационна чувствителност (нормален вибрационен праг) < 25V и > 25V– нарушена вибрационна чувствителност.

З) Изследвани биохимични маркери:

- ***RBP4*** (Human RBP4 ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);
- ***Хемерин*** (Human Chemerin ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);
- ***Лумикан*** (Human Lumican (LUM) ELISA kit , MyBiosource, UK);
- ***Пентраксин 3*** (Human Pentraxin 3 ELISA kit, Bio Vendor, Czech Repuplic);
- ***WISP2*** (Human WISP2 ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);
- ***Фетуин А*** (Human Fetuin A, ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic);
- ***Ангиопоетин-подобен протеин 6*** (Human Angiopoietin Like Protein 6 ELISA Kit, Abbexa, UK);
- ***Фибробластен растежен фактор 21*** (Human Fibroblast Growth Factor 21, BioVendor)
- ***Секс хормон свързващ глобулин*** (SHBG ELISA kit, Dia Source, Belgium)

Пробите за оценка на серумните биомаркери бяха складирани на -80 º С при строго спазване на изискванията за преданалитичната фаза до извършване на анализа. Той бе извършен чрез имуноензимен метод ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) с помощта на комерсиално достъпни китове на апарат StatFax2100. Пробите са изработени в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“.

И) Изследвани генетични маркери:

PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K полиморфизми е извършено в Националната Генетична Лаборатория, използвайки високомолекулна

ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки. По международни изисквания венозната кръв се взема в пласмасова епруветка (с обем от 3–10 ml) съдържаща K_3 EDTA (етилен диамин тетраацетат), като антикогулант. Кръвта се съхранява при +4° C в продължение на максимум 48 часа. Ако не може да бъде обработена в този период от време, тя се замразява от –20 до–70 ° C.

Аналитичната обработка включваше:

- Полимеразна верижна реакция (Polimarase Chain Reaction – PCR). Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулната диагностика. Състои се в in vitro ензимно намножаване (амплификация) на избрани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции. Методът е разработен от Kary Mullis през 1985г. Във всяка амплификационна реакция участват:

- ДНК едноверижна матрица за осъществявания процес, получена след термична денатурация на геномната ДНК;
- Taq–полимераза – осъществява процеса на намножаване на желаната ДНК последователност. Ензимът е термостабилен и запазва своята активност при 94°C. Оптималната температура за синтеза с Taq–полимеразата е 72°C. Необходимата концентрация на ензима за амплификационна реакция е 1 до 5U;
- Дезоксинуклеотидтрифосфати (дНТФ) – дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ. Служат като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига, като се включват избирателно на принципа на комплементарност. Задължително условие е четирите типа дНТФ да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес. Оптималната концентрация е 20–200 μM за всеки нуклеотид;
- Реакционен буфер – осигурява подходящото pH=8.3–9.0 на средата и необходимите йони за работа на ензима. Включва в състава си 10–50

μM Tris– HCl с pH=8.3–9.0; до 50 μM KCl и 0.5–5.0 mM $MgCl_2$. Освен това, може да съдържа и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти (като DMSO–диметил сулфооксид) и други. Компонентите на буфера могат да варират качествено и количествено, в зависимост от изискванията на конкретната Taq–полимераза.

Табл. 1. Нуклеотидна последователност на праймерите, използвани за амплификация на локуси от гена за PNPLA3 I148M, TM6SF2 rs58542926

ГЕН	**Нуклеотидна последователност на праймерите**
PNPLA3 I148M	F 5’TCAGGAAAATTAAAAGGGTGCT3’ R 5’TTTCTCTGCTAGCGCTGAGTC 3’
TM6SF2 rs58542926	F 5'ACAGATGTCCAGCAGGGTTC 3' R 5'TGAACTTTCCCCGTGTCAGT 3'

Резултати

Изследване на RBP4, Лумикан и Хемерин

при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет

Изследваният клиничен контингент обхващаше 79 пациенти, от които 6 (7,6%) мъже и 73 (92,4%) жени. Средната възраст на участниците в проучването е 50,9±11,1 години в интервала между 25 и 73.

Резултатите от сравнителния анализ между групите с и без предиабет по възраст и антропометрични характеристики са представени на таблица 2.

Табл. 2 Характеристика на пациентите със затлъстявене без и с предиабет по възраст и антропометрични показатели, изследвани за RBP4, Хемерин и Лумикан.

Показатели	**Без предиабет** n=41		**С предиабет** n=38		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
Възраст (години)	51,20	12,97	50,68	8,83	0,840
ИТМ (кг/м2)	36,68	6,05	36,33	5,24	0,741
Талия (см)	110,07	12,38	107,36	14,65	0,262
Ханш (см)	119,05	11,02	116,89	11,34	0,631
Мастна тъкан (%)	45,84	5,44	46,63	5,51	0,437
WHR	0,912	0,073	0,908	0,067	0,850
WSR	0,687	0,082	0,664	0,092	0,271
VAI	1,71	0,90	3,04	1,49	**<0,001**

Не се установи разлика по възраст, ИТМ, талия, ханш, мастна тъкан, WHR и WSR. Сигнификантна разлика се установи само при VAI. Със значимо по-висока средна стойност беше групата със затлъстяване и предиабет (3,04±1,49 с/у 1,71±0,90, p<0,001).

Сравнителният анализ на пациентите **без и с предиабет** по Лумикан, Хемерин и RBP4 е представен на **табл. 3**.

Табл. 3. Сравнителен анализ на пациентите без и с предиабет по Лумикан, Хемерин и RBP4

Показатели	**Без предиабет** n=41		**С предиабет** n=38		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
Лумикан	0,080	0,048	0,117	0,074	**0,010**
Хемерин	196,01	39,56	192,34	47,66	0,710
RBP4	65,30	32,25	78,55	35,74	**0,041**

Анализ на пациентите без и с метаболитен синдром по Лумикан, Хемерин и RBP4

Резултатите от сравнителния анализ между групите без и с МС по Лумикан, Хемерин и RBP4 са представени на **табл. 4**

Табл. 4. Сравнителен анализ на пациентите с и без МС по Лумикан, Хемерин и RBP4

Показатели	**Без МС** n=27		**С МС** n=52		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
Лумикан	0,079	0,048	0,107	0,070	0,058
Хемерин	190,81	40,32	196,02	45,19	0,616
RBP4	61,49	33,97	76,93	33,70	**0,019**

Анализ на пациентите без и с артериална хипертония по Лумикан, Хемерин и RBP4

Между групите без и с **артериална хипертония** не се установи сигнификантна разлика по Лумикан, Хемерин и RBP4 (**табл. 5)**.

Табл. 5: Сравнителен анализ на пациентите с и без артериална хипертония по Лумикан, Хемерин и RBP4

Показател	**Без артериална хипертония** n= 22		**С артериална хипертония** n =57		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
Лумикан	0,087	0,062	0,102	0,066	0,383
Хемерин	197,42	35,80	193,01	46,23	0,755
RBP4	72,54	35,07	71,21	34,41	0,938

Анализ на пациентите без и с дислипидемия по RBP4, Хемерин и Лумикан

Класифицирането на пациентите с дислипидемия е дадено в глава Материали и методи, подточка Е. Основни дефиниции и диагностични методи.

Сравнителният анализ на пациентите без и с дислипидемия по Лумикан, Хемерин и RBP4 е представен на **табл.6**.

Табл. 6. Сравнителен анализ на пациентите без и с дислипидемия по Лумикан, Хемерин и RBP4

Показатели	**Без дислипидемия** n=41		**С дислипидемия** n=38		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
Лумикан	0,089	0,056	0,104	0,071	0,441
Хемерин	188,67	39,40	199,76	47,68	0,265
RBP4	65,13	38,09	78,42	28,89	**0,013**

Изследване на връзката между нивата на Лумикан, Хемерин, RBP4 и индекса за чернодробна стеатоза (HSI), индекса глезен мишница (ABI), интима медиа дебелина (IMT), индекса за периферна невропатия (NDS), вибрационен праг (VPT) и риска за автономна невропатия (ANR)

Резултатите от коефициентите на корелация между Лумикан, Хемерин и RBP4 и HSI, ABI, NDS, VPT и ANR при пациенти с и без предиабет са представени на табл. 7 и 8.

Табл. 7. Коефициенти на корелация между Лумикан, Хемерин и RBP4 и HSI, ABI, NDS, VPT и ANR **(пациенти без предиабет)**

Показатели	Лумикан	Хемерин	RBP4
HSI	0,149	0,171	-0,021
ABI	-0,116	-0,144	-0,020
IMT	-0,085	-0,024	0,037
NDS	0,203	0,017	-0,050
VPT	-0,150	-0,261	0,008
ANR	-0,237	0,125	-0,017

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Анализазът показа, че единствено **Хемерин** корелира изразено и провопропорционално с индекса за чернодробна стеатоза (HSI) (p= 0,550) и то само в групата с предиабет.

Определяне на предиктивната стойност на RBP4, Хемерин и Лумикан за риск от предиабет

За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ. Поради това, че от изследваните количествени показатели само Хемерин има нормално разпределение за останалите два бе приложен метода на ROC кривите за установяване на сигнификантна прагова стойност.

При така установените прагови стойности (≥ 0,07 ng/ml за Лумикан и ≥ 61 mcg/ml за RBP4), стойностите на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет имаха сравнително невисоки, но приемливи проценти.

Бинарната логистична регресия даде следните резултати:

При пациентите с нива на **Лумикан ≥ 0,07 ng/ml** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на предиабет е **3,9 пъти по-висок** (OR 3,945, 95% CI 1,518-10,254, p=0,005).

При пациентите с нива на **RBP4 ≥ 61 mcg/ml** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на предиабет е **3,5 пъти по-висок** (OR 3,544, 95% CI 1,385-9,072, p=0,008). При Хемерин отношението на шансовете нямаше статистическа достоверност. В групов план показателите Лумикан и RBP4 запазиха рисковите си предиктивни стойности.

Определяне на предиктивната стойност на Лумикан, Хемерин, RBP4 за риск от МС

За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ за двете групи пациенти – с и без метаболитен синдром.

От изследваните количествени показатели нормално разпределение имаше Хемерин. За останалите бе приложен метода на ROC кривите за

установяване на сигнификантни прагови стойности. Бинарната логистична регресия даде следните резултати:

При пациенти със стойности на **RBP4 ≥ 55 mcg/ml** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на МС е **3,1 пъти по-висок** (OR 3,148, 95% CI 1,178-8,414, p = 0,022). При Лумикан и Хемерин отношението на шансовете нямаше статистическа достоверност.

Изследване на WISP2, PTX3, ELF, FIB-4, NFS, APRI, Фетуин A, FGF 21, AGF, SHBG и генетичните полиморфизми PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет

Изследваният клиничен контингент обхващаше общо 218 пациенти, от които 40 (18,3%) мъже и 178 (81,7%) жени. Средната възраст на участниците в проучването беше 50,2±10,8 години в интервала между 27 и 78 години.

Сравнителеният анализ на изследваните групи по артериално налягане, липиден профил, кръвна захар и инсулин от ОГТТ на 0, 60 и 120 мин., индексите HOMA- IR, Quicky, Stumwoll, Bennett са представени на **таблица 8.**

Табл. 8. Сравнителен анализ на изследваните групи по артериално налягане, липиден профил. КЗ 0 -кръвна захарна на 0 мин. от ОГТТ, КЗ 60 – кръвна захар на 60 мин, КЗ120 – кръвна захар на 120 мин. и инсулин на 0, 60 и 120 мин. от ОГТТ, индекси HOMA- IR, Quicky, Stumwoll, Bennett

Показатели	**Без предиабет** n=135		**С предиабет** n=83		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
САН (mmHg)	132,07	16,22	135,21	15,80	0,149
ДАН (mmHg)	81,63	10,02	85,18	10,25	**0,021**
Общ холестерол (mmol/l)	5,18	1,02	5,28	0,98	0,329
HDL (mmol/l)	1,30	0,33	1,17	0,27	**0,007**
LDL (mmol/l)	3,22	0,89	3,17	0,93	0,699
VLDL (mmol/l)	0,65	0,28	0,85	0,31	**<0,001**
ТГ (mmol/l)	1,51	0,81	2,10	1,00	**<0,001**
КЗ 0 (mmol/l)	5,33	0,52	6,90	2,69	**<0,001**
КЗ 60 (mmol/l)	8,36	2,31	11,10	2,50	**<0,001**
КЗ 120 (mmol/l)	5,55	1,48	8,63	2,31	**<0,001**
Инсулин 0 (mU//L)	15,03	8,67	25,24	29,26	**<0,001**
Инсулин 60 (mU//L)	107,03	67,83	136,66	105,68	**0,024**
Инсулин 120 (mU//L)	53,40	42,81	123,93	136,34	**<0,001**
HOMA-IR	3,53	2,20	7,04	8,40	**<0,001**
Quicky	2,63	5,37	1,32	0,44	**<0,001**
Stumwoll	0,05	0,04	0,01	0,08	**<0,001**
Bennett	1,32	0,32	1,03	0,28	**<0,001**

Резултатите от сравнителния анализ между групите без и с предиабет по WISP2, HA, PIIINP, TIMP-1, ELF и PTX3 са представени на **таблица 9**.

Табл. 9. Сравнителен анализ на изследваните групи по WISP2, HA, PIIINP TIMP-1, ELF, PTX3

Показатели	**Без предиабет**			**С предиабет**			**P**
	N	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
WISP2	47	768,78	593,23	32	630,85	256,49	0,704
HA	32	39,15	34,12	16	52,03	37,88	0,128
PIIINP	32	8,56	2,85	16	8,89	2,48	0,650
TIMP-1	34	215,62	42,76	18	228,16	51,10	0,352
ELF	34	9,11	0,84	18	9,34	0,72	0,256
PTX3	47	1877,03	895,45	30	2321,29	926,63	**0,028**

Анализът показа, че сигнификантна разлика се установява само при **PTX3**. Със значимо по-висока средна стойност беше групата на предиабет. Последващите сравнения показаха, че наличието на хипертония, дислипидимия, МС и броя на компонентите на МС не оказват влияние върху нивата на показателите WISP2, ELF и неговите компоненти (HA, PIIINP, TIMP-1) и PTX3.

Резултатите от сравнителния анализ между групите без и с предиабет по отношение на фиброзните скорове FIB-4 и APRI са показани на **табл. 10.**

Табл. 10. Сравнителен анализ на пациентите без и с предиабет по фиброзните скорове FIB-4 и APRI

Показател	**Без предиабет** n = 121		**С предиабет** n= 84		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
FIB-4	0,83	0,34	0,89	0,34	0,198
APRI	0,17	0,08	0,21	0,10	**0,031**

Резултатите показаха, че няма сигнификантна разлика между средните стойности на FIB-4 в двете изследвани групи (p=0,198). Пациентите с и без предиабет се различават статистически значимо по показателя **APRI,** като с по-висока средна стойност е групата с предиабет (p=0,031).

Изследване за предиктивната стойност на показателите WISP2, PTX3, ELF, HA, PIIINP TIMP-1, FIB-4, APRI и NFS за предиабет, ИР и МС. За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ. От изследваните количествени показатели нормално разпределение имаше ELF и част от неговите компоненти (PIIINP, TIMP-1). За останалите 5 бе приложен метода на ROC кривите за установяване на сигнификантна прагова стойност. Прагови стойности бяха установени за два от тях – FIB-4 и APRI. При така установените прагови стойности (**≥ 0,57 за FIB-4 и ≥ 0,18 за APRI**), стойностите на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет имат сравнително невисоки, но приемливи проценти. При имащите **APRI ≥ 0,57** спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на предиабет е със **77% по-висок** (p=0,047). Останалите показатели участващи в анализа не показаха предиктивна стойност по отношение на риска от предиабет, МС и ИР.

Изследване на Фетуин А, FGF 21, AGF и SHBG

Сравнителният анализ между групите със затлъстяване без предиабет и затлъстяване с предиабет по изследваните хепатокини **FGF 21, AGF, SHBG и Фетуин А** е представен на **табл. 11.**

Табл. 11. Сравнителен анализ на групите без и с предиабет по изследваните хепатокини

Хепатокини	**Без предиабет n=46**		**С предиабет n=36**		**P**
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	
Фетуин А	717,03	181,84	661,43	148,26	0,141
FGF21	360,60	298,09	450,98	264,82	**0,010**
AGF	8,55	1,70	8,15	1,69	0,293
SHBG	49,85	28,12	43,89	19,48	0,604

Анализът установи сигнификантна разлика само при **FGF21**. Със значимо по-висока средна стойност беше групата с предиабет (p=0,010).

По отношение на МС се установиха подобни резултати представени на **табл. 12.**

Табл.12: Сравнителен анализ на пациенти без и с МС по изследваните хепатокини

Хепатокини	**Без метаболитен синдром** n=24			**С метаболитен синдром** n=58		**P**
	$\overline{X}$	SD		$\overline{X}$	SD	
Фетуин А	700,28	214,32	58	689,45	148,75	0,823
FGF21	261,33	132,83	58	457,78	312,24	**<0,001**
AGF	8,53	1,95	58	8,31	1,59	0,594
SHBG	56,35	32,45	57	43,35	19,69	0,209

Анализът показа значимо по-висока средна стойност на **FGF21** и в групата с дислипидемия (p=0,004). По отношение на инсулиновата резистентност, сигнификантна разлика се установи отново само при **FGF 21**. Анализът показа значимо по-висока средна стойност на **FGF21** в групата с инсулинова резистентност (p=0,020).

Между изследваните хепатокини и **показателите за микро- и макроангиопатия** (индекса глезен мишница (ABI), интима медиа дебелина (IMT), индекса за периферна невропатия (NDS), вибрационния праг (VPT) и риска за автономна невропатия (ANR), както и HSI бяха установени малък брой слаби корелации. Корелации се наблюдават само при Фетуин А и ABI – слаба и еднопосочна и между AGF и HSI - обратнопропорционална и слаба.(Табл.13)

Табл. 13: Коефициенти на корелация между изследваните хепатокини и HSI, ABI, IMT, NDS, VPT и ANR

Показатели	Фетуин А	FGF21	AGF	SHBG
HSI	-0,175	0,161	**-0,232***	-0,195
ABI	**0,221***	0,034	-0,020	0,147
IMT	-0,014	0,054	0,020	0,101
NDS	-0,076	-0,028	-0,045	0,116
VPT	0,086	-0,052	0,195	-0,085
ANR	0,095	0,022	-0,093	-0,173

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Предиктивна стойност на Фетуин А, FGF 21, AGF и SHBG по отношение на риска за предиабет, МС и ИР

Риск за предиабет

За целта беше приложен бинарен логистичен регресионен анализ. Поради това, че от изследваните биомаркери само Фетуин А и AGF имат нормално разпределение за останалите два бе приложен метода на ROC кривите за установяване на сигнификантна прагова стойност. За **FGF21** такава стойност бе установена **(≥ 320 pg/ml),** докато за SHBG такава нямаше. Стойностите на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с и без предиабет по FGF21 имаха сравнително добри величини.

Бинарната логистична регресия показа наличие на сигнификантно влияние единствено на **FGF21 – при имащите стойности ≥ 320 pg/ml** рискът за

възникване на предиабет е **4,2 пъти по-висок** спрямо този на пациентите с по-ниски стойности.

Риск за МС

Както и при въглехидратните нарушения единствено при **FGF21** бе намерена сигнификантна прагова стойност (**≥ 270 pg/ml**), при която се получават много добри величини на критериите за валидизация. Бинарният логистичен регресионен анализ показа влияние единствено на **FGF21** – при имащите **стойности ≥ 270 pg/ml** рискът за възникване на **МС** е **4 пъти по-висок** спрямо този на пациентите с по-ниски стойности.

Риск за ИР

И в този случай единствено при **FGF21** бе намерена сигнификантна прагова стойност
(≥ 260 pg/ml), при която се получиха много добри величини на критериите за валидизация. Бинарният логистичен регресионен анализ установи влияние единствено на **FGF21** – при имащите **стойности ≥ 260 pg/ml** рискът за възникване на ИР е **3,2 пъти по-висок** спрямо този на пациентите с по-ниски стойности.

Генетични полиморфизми PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K при пациенти с НАСБ, предиабет и МС и връзката им с изследваните биохимични показатели, хепатокини и фиброзни скорове

PNPLA3 I148M

Честотното разпределение на нормалните хомозиготи (CC), хомозиготните (GG) и хетерозиготните (CG) полиморфизми на I148M вариант в PNPLA3 ген е представено на **табл. 14**.

Табл. 14. Разпределение на норми и варианти (в хомо- и хетерозиготно състояние) на I148M полиморфизма в PNPLA3 при всички пациенти с НАСБ

PNPLA3	**n**	**Относителен дял (%)**	**Sp**
CC	121	58,2	3,4
CG	77	37,0	3,2
GG	10	4,8	1,4
Общо	208	100,0	

При PNPLA3 с най-голям относителен дял (55,5%) бяха нормалните хомозиготи (CC), следвани от хетерозиготните варианти (CG) 35,3%, а най-малко (4,6%) бяха хомозиготните варианти (GG).

Анализ на връзката между генетичните промени на PNPLA3 и ОХ, HDL, LDL, ТГ, VLDL, АСТ, АЛТ и ГГТ е показан на **табл. 15**

Табл. 15. Анализ на връзката между PNPLA3 в норма и вариант и показателите ОХ, HDL, LDL, ТГ, VLDL, АСТ, АЛТ и ГГТ

Показатели	PNPLA3								
	CC			CG			GG		
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD
ОХ	121	5,19[a]	1,03	77	5,29[a]	0,99	10	5,26[a]	0,85
HDL	120	1,25[a]	0,30	77	1,22[a]	0,31	10	1,12[a]	0,21
LDL	115	3,19[a]	0,92	73	3,28[a]	0,92	10	2,94[a]	0,64
VLDL	111	0,70[a]	0,32	72	0,74[a]	0,26	10	0,93[a]	0,46
ТГ	120	1,63[a]	0,91	77	1,83[a]	0,93	10	2,17[a]	1,15
АСТ	119	18,35[a]	6,18	76	21,95[b]	10,93	10	30,27[c]	14,47
АЛТ	121	21,74[a]	12,08	76	25,93[ac]	18,77	10	34,20[bc]	15,63
ГГТ	117	35,21[a]	38,88	74	45,23[a]	60,48	8	87,00[b]	86,53

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p<0,05$)

Анализът показа, че единствено при АСТ, АЛТ и ГГТ се наблюдава сигнификантна разлика между средните стойности на групите с нормални хомозиготи (CC), хетерозиготи (CG) и хомозиготи (GG) по патологичния алел. При АСТ групите с хомозиготни и хетерозиготни варианти имаха значимо по-висока средна стойност на показателя спрямо тази на нормалните хомозиготи, като най-високата е при GG, която е сигнификантно по-висока и от тази при CG. Хомозиготите по патологичния алел бяха със статистически достоверно по-висока средна стойност на АЛТ спрямо тези на нормалните хомозиготи, но не и от тази на групата с CG хетерозиготи, която не се различаваше от тези на

останалите две групи. При ГГТ статистически достоверно по-висока средна стойност се наблюдаваше в групата на хомозиготите по патологичния алел спрямо останалите две групи, които не се различаваха статистически по този показател.

TM6SF2 E167K

Честотното разпределение на нормалните хомозиготи (CC) и хетерозиготните полиморфизми (CT) на E167K вариант в TM6SF2 ген е представено на **табл. 16**. Хомозиготи по патологичния алел при този ген в иследваните пациенти не бяха открити.

Табл. 16. Разпределение на норми в хомозиготно (CC) и варианти в хетерозиготно (CT) състояние на E167K полиморфизъм в TM6SF2 ген при всички изследвани пациенти

TM6SF2	n	Относителен дял (%)	Sp
CC	194	89,0	2,1
CT	14	11,0	1,7
Общо	208	100,0	

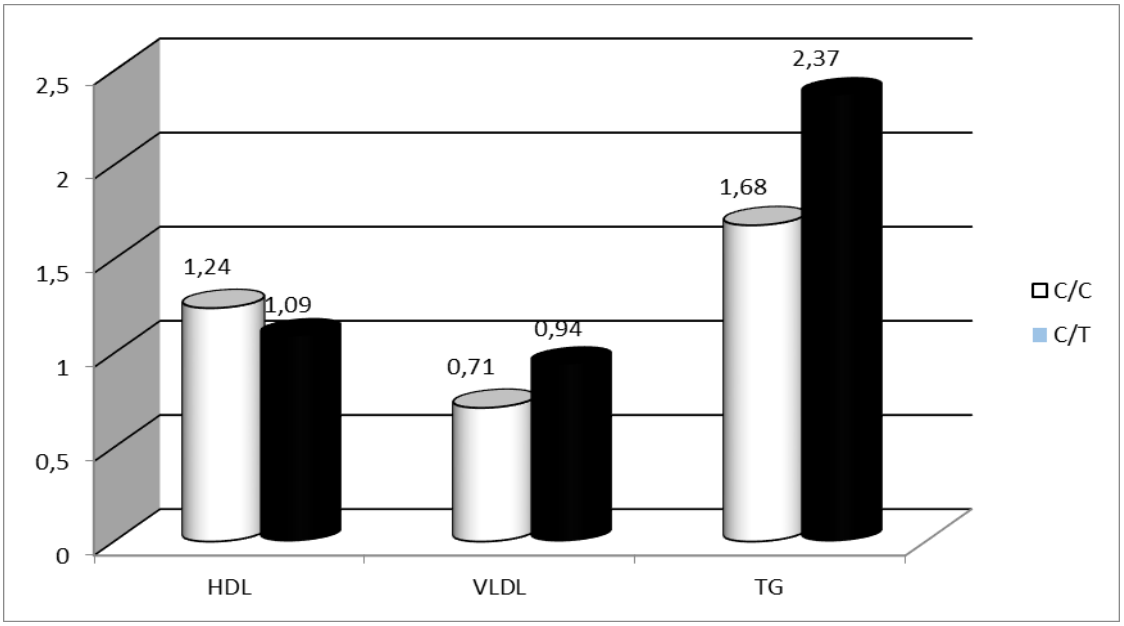
При TM6SF2 с най-голям относителен дял (89%) отново са нормалните хомозиготи CC, следвани от CT хетерозиготните варианти с 11,0%.

Значително по-голям брой показатели със сигнификантни разлики се установи при анализа на връзката между тях и TM6SF2 в норма и вариант. Анализът показа, че групата с CT хетерозиготните варианти имаше значимо по-високи средни стойности при показателите КЗ на 0 мин., КЗ на 60 мин. и КЗ на 120 мин., инсулин на 0 мин. и 120 мин., и HOMA-IR.

Групата с CC нормални хомозиготи имаха статистически достоверно по-високи средни стойности при индексите Bennett, QUICKI и ISIstumvoll. При останалите показатели в таблицата разликите или нямаха сигнификантна стойност или броят на случаите с CT хетерозиготни варианти не позволи да се направят достоверни статистически изводи.

По отношение на липидните показатели хетерозиготите по патологичния алел на TM6SF2 имаха значимо по-високи средни стойности при показателите **VLDL и ТГ**.

Групата на нормалните хомозиготи имаше статистически достоверно по-висока средна стойност при HDL. (Фиг.1)



Фиг. 1. Анализ на връзката между TM6SF2 и HDL, VLDL и ТГ ($p<0.05$)

Анализ на връзката между PNPLA3 и TM6SF2 и предиабета, МС, ИР и дислипидемията

Сравнителният анализ между групите със затлъстяване без въглехидратни нарушения и затлъстяване с предиабет по двата гена е представен на **табл. 17.**

Табл. 17. Анализ на връзката между норми и варианти на PNPLA3 и TM6SF2 в групите с и без предиабет

Ген	**Алели**	**Честота**	**Без предиабет**	**С предиабет**	**P**
PNPLA3	CC	n	90	31	**<0,001**
		%	72,0[a]	37,3[b]	
	CG	n	31	46	
		%	24,8[a]	55,4[b]	
	GG	n	4	6	
		%	3,2[a]	7,2[a]	
TM6SF2	CC	n	123	71	**<0,001**
		%	98,4[a]	85,5[b]	
	CT	n	2	12	
		%	1,6[a]	14,5[b]	

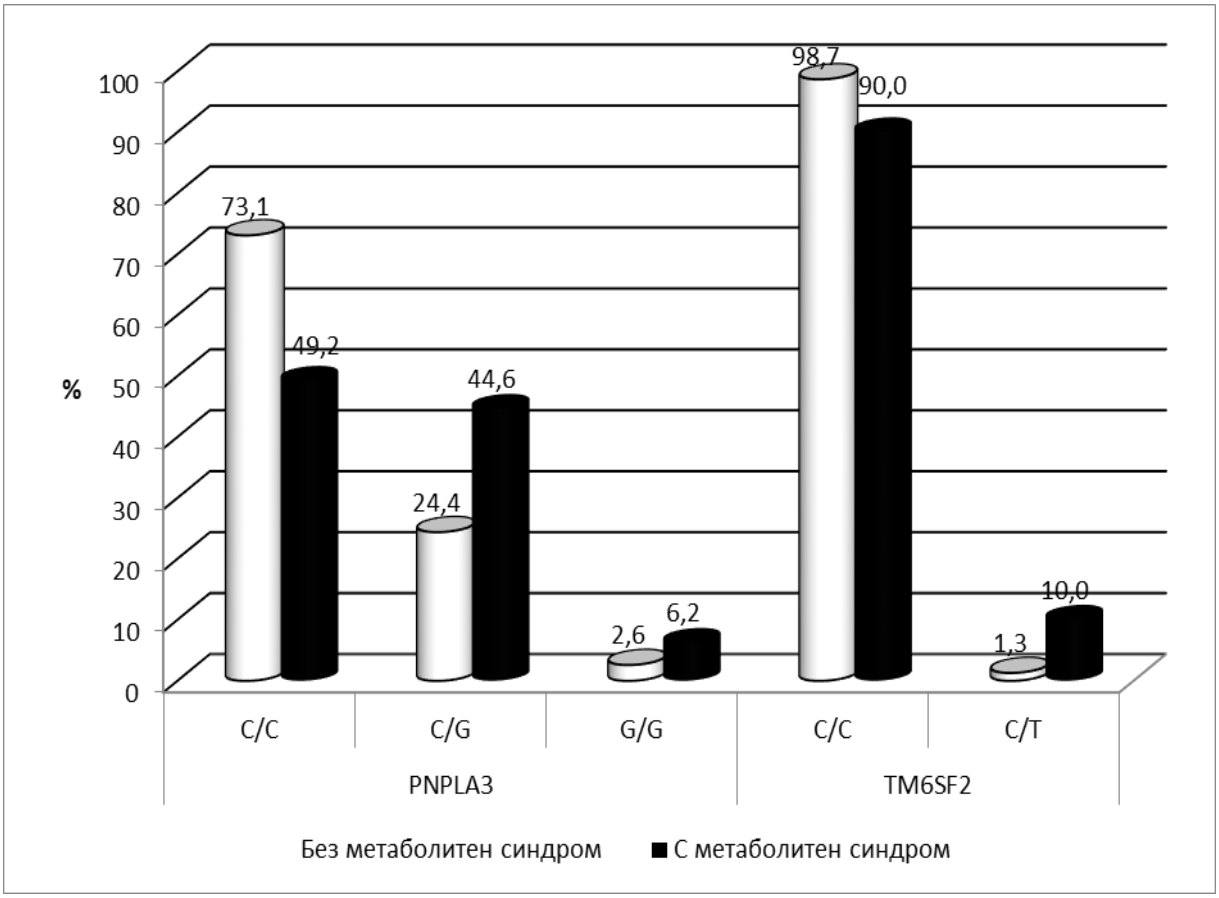
* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (p<0,05)

Анализът показа сигнификантна зависимост между генетичните промени и **предиабета.**

При **PNPLA3**, процентът на хетерозиготните варианти беше значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази без такава статистически достоверно по-висок беше относителният дял на нормалните хомозиготи (p<0,001). При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не бе установена.

При **TM6SF2** процентът на хетерозиготните варианти също беше значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази без предиабет - статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи (p<0,001).

Резултатите от анализа на връзката между генетичните промени и **МС** са представени на **Фиг.2.**



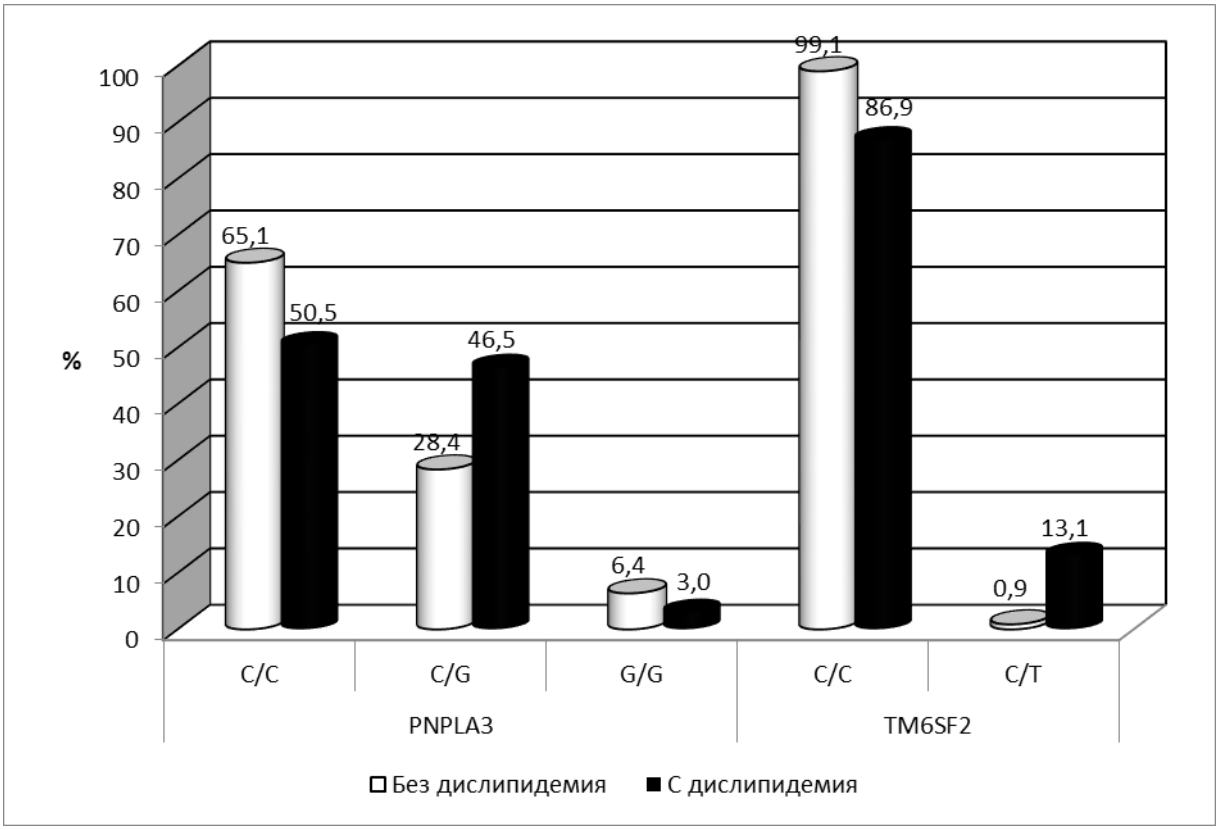
Фиг 2. Анализ на връзката между норми и варианти на PNPLA3 и TM6SF2 и МС

Установихме сигнификантна зависимост между генетичните промени и **МС**. При **PNPLA3**, процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи (p=0,003). При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не се установи.

При **TM6SF2** процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи (p=0,019).

Налице бе сигнификантна зависимост само между генетичните промени на **PNPLA3** и **ИР**. Процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с ИР (p=0,038), а в тази без ИР- статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи. При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не бе установена.

Резултатите от анализа на връзката между норми и варианти на PNPLA3 и TM6SF2 и **дислипидемията** са представени на **фиг.3**



Фиг. 3 Анализ на връзката между норми и варианти на PNPLA3 ген и TM6SF2 ген и дислипидемията

При **PNPLA3** процентът на хетерозиготните варианти бе значимо по-голям в групата с дислипидемия, а в тази без дислипидемия - статистически достоверно по-висок бе относителният дял на нормалните хомозиготи (p=0,021). При хомозиготните варианти сигнификантна разлика в относителните му дялове в изследваните групи не беше установена.

При **TM6SF2** различията имаха идентичен характер (p<0,001), като характерното за изследвания полиморфизъм в този ген беше връзката му с повишените ТГ и VLDL, което беше отбелязано по-горе на фиг. 19.

Анализът между PNPLA3, TM6SF2 и изследваните хепатокини FGF 21, AGF, футуин А и SHBG не показа наличие на сигнификантна връзка.

Анализът на връзката между генетичните нарушения в двата гена и показателите за микро- и макроангиопатия (ABI, IMT, NDS, ANR и VPT) също не показа наличие на сигнификантна връзка.

Изследване на риска при генетичните промени за развитието на предиабет, МС и ИР

Изследване на рискът за **предиабет**. За целта беше приложен множествен бинарен логистичен регресионен анализ, резултатите от който са показани на **табл. 18.**

Табл. 18. Резултати от регресионния анализ за оценка на предиктивната стойност на изследваните гени и алели за възникване на предиабет

Гени	**Сравнение на алелите**	**Индивидуално**				**Групово**			
		OR	95% CI		p	OR	95% CI		p
			Долна граница	Горна граница			Долна граница	Горна граница	
PNPLA3	CG+GG / CC	9,649	2,100	44,328	**0,004**	4,363	2,339	8,138	**<0,001**
TM6SF2	CT/ CC	3,913	2,177	7,035	**<0,001**	11,024	2,211	54,954	**0,003**

В индивидуален план със сигнификантни отношения на рисковете се оказаха и двата изследвани гена PNPLA3 и TM6SF2.

При хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена **PNPLA3 (CG+GG)** спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на **предиабет** е **9,6 пъти** по-висок (p<0,001).

При хетерозиготните варианти на гена **TM6SF2 (CT)** спрямо нормални хомозиготи, рискът за възникване на предиабет е **3,9 пъти** по-висок (p=0,03).

По отношение на рискът от **МС** свързан с генните мутации бинарната логистична регресия даде следните резултати **(табл. 19).**

Табл. 19. Резултати от регресионния анализ за оценка на предиктивната стойност на изследваните гени и алели за възникване на МС

Гини	**Сравнение на алелите**	**Индивидуално**				**Групово**			
		OR	95% CI		p	OR	95% CI		p
			Долна граница	Горна граница			Долна граница	Горна граница	
PNPLA3	CG + GG / CC	2,939	1,590	5,434	**0,001**	3,043	1,642	5,638	**<0,001**
TM6SF2	CT / CC	8,444	1,082	65,881	**0,042**	10,633	1,341	84,320	**0,025**

При хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена **PNPLA3 (CG+GG)** спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на **МС** е почти **3 пъти** по-висок (p=0,001). При хетерозиготните варианти на гена **TM6SF2** спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на **МС** е **8,4 пъти по-висок** (p=0,042).

В групов план тези фактори запазиха рисковия характер на своето влияние, като PNPLA3 запази стойността на отношението на рисковете, а TM6SF2 го увеличи.

По отношение на рискът от ИР свързан с генните мутации, бинарната логистична регресия даде следните резултати **(табл.20):**

Табл. 20: Анализ на връзката между генетичните промени и инсулиновата резистентност

Ген	Алели	Честота	Без ИР	С ИР	Р
PNPLA3	CC	n	38	81	**0,038**
		%	71,7[a]	54,4[b]	
	CG	n	15	59	
		%	28,3[a]	39,6[a]	
	GG	n	0	9	
		%	0[a]	6,0[a]	
TM6SF2	CC	n	51	138	0,520
		%	96,2[a]	92,6[a]	
	CT	n	2	11	
		%	3,8[a]	7,4[a]	

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (p<0,05)

Със сигнификантно отношение на рисковете се оказа единствено генът PNPLA3. При хетерозиготните варианти на този ген (CG+GG) спрямо нормалните хомозиготи, рискът за развитие на ИР е **2,1 пъти** по-висок (p= 0,038**).**

Обсъждане

Неалкохолната стеатозна болест е най-честото чернодробно заболяване както при възрастните, така и при децата, което се асоциира с инсулинова резистентност и е тясно свързано с метаболитния синдром. Поради нарастващата епидемия от затлъстяване и ЗД2, заедно със застаряването на населението, разпространението на НАСБ се увеличава значително, като обхваща до една четвърт от възрастните хора по света. Значението на НАСБ се дължи на факта, че не се ограничава само като прогресивно чернодробно заболяване, но също така включва и голям брой извънчернодробни усложнения. Водещите причини за смъртност сред пациентите с НАСБ са сърдечно-съдови заболявания, последвани от нечернодробни карциноми и усложненията на НАСБ, включително цироза и хепатоцелуларен карцином.

НАСБ представлява едно мултисистемно заболяване, при което се нарушава регулирането на множество метаболитни и възпалителни пътища, играещи важна роля в развитието на редица ССЗ, ЗД2 и други метаболитни заболявания.

НАСБ се свързва също така със значителни икономически разходи, като пациентите с терминални чернодробни усложнение са основна група кандидати за чернодробна трансплантация. Нарастващото разпространение на НАСБ и тежките потенциални усложнения на НАСХ създават необходимост от търсене и използване на ефективни методи за идентифициране на тези пациенти. Въпреки че биопсията е призната за златен стандарт за диагноза на НАСБ, съществуват много ограничения за нейното приложение, свързани с квалифициран персонал, невъзможност за масова практика, както и риск за тежки усложнения, вкл. смъртност, кървене и болка. Ето защо се търсят неинвазивни методи за избягване на

биопсията в диагностиката на НАСБ, като в тази насока усилено се работи през последните години. Приложението на достатъчно надеждни биохимични, генетични, инструментални и др. методи би могло също така да идентифицира най-рисковите лица за бърза прогресия на НАСБ, които да бъдат насочени за хистологична оценка.

Установено е, че черният дроб може да повлияе на метаболизма на липидите и глюкозата чрез освобождаване на хепатокини, като НАСБ се свързва с промененото им производство. Някои от тях могат директно да повлияят риска от ЗД2 чрез неблагоприятно въздействие върху чернодробната глюконеогенеза, синтеза на гликоген и инсулиновата сигнализация. Освен това изглежда, че хепатокините могат да се разглеждат като биомаркери за ектопично натрупване на мазнини в черния дроб, както и като маркери за прогресията на заболяването. Предполага се, че някои от тях могат да бъдат цел за превенция и лечение на заболявания, свързани с инсулиновата резистентност, включително предиабета и НАСБ.

От друга страна през последните години се обръща все повече внимание на генетичните основи на НАСБ, както и на връзката им с факторите на околната среда в патогенезата на НАСБ с цел търсене на нови диагностични и терапевтични възможности.

Ние си поставихме за цел да анализираме потенциални неинвазивни биомаркери, включително и генетични, свързани с НАСБ и тяхната връзка със затлъстяването и предиабета, които биха могли да се включат в бъдещи диагностични и мониторингови алгоритми. Популационната характеристика на пациентите и изследванията, които планирахме бяха определени от няколко съображения:

1. Всички пациенти бяха с НАСБ в по-ранна фаза на развитие (НАС), която доказано е обратима, като беше изключена напреднала

фиброза чрез използването на различни неинвазивни методи за оценка.

2. Тъй като връзката на НАСБ със затлъстяването е добре известна, ние елиминирахме влиянието на този фактор като всички пациенти бяха със затлъстяване в различна степен.

3. Тъй като връзката на НАСБ и на затлъстяването с диабета е детайлно описана, ние се спряхме на предиабета, който привлича все повече международното научно внимание като състояние с повишен сърдечносъдов и метаболитен риск, което е последната реална възможност да се промени гликемичната траектория на пациента и да не бъде допуснато развитието на диабет. Данните в литературата за НАСБ и предиабет са оскъдни. Така нашите пациенти бяха с НАСБ и затлъстяване, но се различаваха по отношение на това дали имат или не предиабет. Диабетът беше изключващ критерии. Правейки този избор си дадохме сметка за риска, който поемаме, ориентирайки се към преходно състояние с ранни промени в хода на глюкозния континиум. Тези деликатни изменения намаляват вероятността за статистически значими разлики в изследваните показатели, особено като се има предвид невисоката честота на предиабета от една страна и лимитираният брой изследвани лица поради ограничения финансов ресурс, базиран на университетските грантове от друга.

4. При избора на биохимични, генетични и инструментални показатели се ръководехме от съображението наред с известни и валидирани индикатори за НАСБ и предиабет да съсредоточим вниманието си върху съвсем нови в световен мащаб неработени в България показатели при използваният от нас дизайн на изследванията.

5. Обобщавайки казаното, с изследванията си търсехме нови маркери за една слабо проучена интердисциплинарна област (НАСБ и предиабет) в ранните етапи на двете състояния, които са потенциално обратими и представляват интерес освен в научен, така и в чисто практически аспект.

Ретинол свързващ протеин 4

Ретинол свързващ протеин 4 (RBP4) участва в развитието на инсулиновата резистентност и се свързва с прогресията на тежестта на НАСБ. Няма обаче достатъчно данни за връзката му с ранните етапи от нарушената глюкозна регулация при пациенти с НАСБ.

В нашето проучване установихме значимо по-високи средни стойности на RBP4 в групата на НАСБ с предиабет, както и при лицата с метаболитен синдром, в сравнение с групата със затлъстяване без въглехидратни нарушения и без метаболитен синдром. Влияние на артериалната хипертония не се установява върху нивата на RBP4, за разлика от дислипидемията. Със значимо по-висока средна стойност е групата на имащите дислипидемия. RBP4 корелира правопропорционално с показателите VAI, кръвна захар на 0 мин, кръвна захар на 60 мин., инсулин на 0 мин., инсулин на 120 мин. и HOMA-IR. Нашите данни съвпадат с данните представени от други автори по отношение на връзката между повишените нива на RBP4 с висцералното затлъстяване и инсулиновата резистентност. Резултатите от проведен мета-анализ от Park и сътр. показват положителни корелации между общия холестерол, триглицеридите и LDL и серумни нива на RBP4 при пациенти със ЗД2.

Други автори не откриват връзка между нивата на RBP4 и кръвната захар или гликирания хемоглобин (HbA1c), като предполагат, че RBP4 не е маркер за въглехидратни нарушения.

От друга страна RBP4 е описан като връзка между нарушеното поемане на глюкоза в адипоцитите и системната инсулинова чувствителност. Увеличените нива на RBP4 могат да действат директно за индуциране на експресията на фосфоенолпируват карбоксикиназа (PCK2) за увеличаване производството на глюкоза и за намаляване на действието на инсулина в хепатоцитите. В допълнение, RBP4 може да предизвика инсулинова резистентност, като допринася за развитието на възпаление в мастната тъкан чрез активиране на проинфламаторни цитокини и макрофаги.

RBP4 е признат рисков фактор за развитие на ЗД2. В дългосрочно проспективно проучване Luft и сътр. показват, че по-високите нива на RBP4 предсказват развитието на ЗД2 по различен начин при мъжете и жените и може би е по-важен фактор за развитието на диабет предимно при женския пол. В нашето проучване 92,4% от изследваната популация бяха жени, поради факта, че бяха обхванати хоспитализирани пациенти от Клиниката по ендокринология и болести на обмяната на УМБАЛ "Александровска", където половото разпределение е почти аналогично. Не се установи корелация с микро- и макросъдовите параметри (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия), което вероятно го прави неподходящ за оценка на микро- и макроваскуларния риск.

По отношение на предиктивната стойност, при имащите серумен RBP4 ≥ 61 mcg/ml спрямо тези с по-ниски нива, рискът за възникване на предиабет е 3,5 пъти по-висок, а при RBP4 ≥ 55 mcg/ml рискът за развитие на метаболитен синдром е 3,1 пъти по-висок. Ние не намерихме проспективно

проучване в литературата, оценяващо предиктивната стойност на серумния RBP4 за развитие на предиабет.

В заключение, в сравнение с контролната група без въглехидратни нарушения, RBP4 е повишен при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет, както и при метаболитен синдром и дислипидемия. Не се установиха корелации между RBP4 и изследваните показателите за микро- и макроангиопатия.

Лумикан

Лумиканът е екстрацелуларен матриксен протеогликан, сравнително скоро обсъждан като показател за чернодробна фиброза. Той участва в колагенната фибриногенеза в някои екстрахепатални тъкани, като значението му при чернодробните заболявания не е напълно изяснено. Имунохистохимичните изследвания показват, че хепатоцитите са преобладаващия източник на лумикановата експресия. Необходимо е да се определи дали повишеният синтез на лумикана е специфичен за НАСБ или играе по-широка роля в прогресията на чернодробната фиброза, независимо от основната етиология на заболяването. Нивата на лумикана са повишени както при пациенти със затлъстяване и нормална чернодробна хистология, така и при начална стеатоза, като най-изявена е експресията му при НАСХ. Различната експресия на лумикан през различните стадии на НАСБ дава възможност за ранна диагноза още в префибротичния стадии на НАСХ.

В нашето проучване установихме значимо по-високи средни стойности на лумикана в групата с предиабет. Ролята на ЗД2 в НАСХ и фиброзата при пациенти със затлъстяване е демонстрирана в няколко проучвания, които оценяват чернодробните биопсии при пациенти със затлъстяване,

извършвани по време на бариатричната хирургия. Общата честота на НАСБ е била 85–99%, а на НАСХ 24–58%.

Във всички проучвания НАСХ е по-често срещан при пациенти със ЗД2 в сравнение с контролите без диабет. Тези резултати потвърждават важността да се оцени рискът от чернодробна фиброза още в ранния предиабетен стадий. В нашето проучване открихме корелации между повишените серумните нива на лумикана и глюкозата на гладно в групата на предиабет. Установените резултати предполагат, че първоначалните фиброзни промени при НАСБ могат да започнат рано - още в предиабетните етапи и може да предположим, че повишеният лумикан като медиатор на фиброзата допринася за това развитие. Връзката между фиброзата на черния дроб и инсулиновата резистентност е разкрита в проучване при хора, при което експресията на колаген тип VI силно корелира с нарушенията на глюкемията.

Анализирайки връзката между метаболитния синдром и лумикана се установи най-силна зависимост при наличие на четири и повече компонента на МС. Не се установи влияние на артериалното налягане и дислипидемията върху стойностите на лумикана. Не се установи корелация с изследваните показатели за микро- и макроангиопатия (индекса за чернодробна стеатоза, индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия). По отношение на предиктивната стойност на лумикана, рискът за възникване на предиабет при лица с НАСБ е 3,9 пъти по-висок при измерени стойности ≥ 0,07 ng/ml.

Ние не намерихме проучване в литературата, оценяващо предиктивната стойност на серумния лумикан за развитие на предиабет.

В заключение, настоящото проучване показа повишени серумни нива на лумикана при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет, както и при наличие на метаболитен синдром. По-високите нива на лумикана са свързани с повишен риск за предиабет при лица с НАСБ и затлъстяване. Не се установи корелация между лумикан и изследавните показатели за микро- и макроангиопатия.

Хемерин

Хемеринът е сравнително скоро открит адипокин, който се счита, че повишава инсулин-стимулираното глюкозно поемане, повишава експресията на адипонектина и инхибира продукцията на проинфламаторни цитокини като IL-6 и TNF-α. Други проучвания установяват сигнификантно повишение на хемерина при пациенти с НАСБ и особено при НАСХ в сравнение със здрави лица. Съществуват противоречиви и не достатъчни данни за връзката на хемерина с въглехидратните нарушения и НАСБ, както и с микро- и макросъдовите параметри.

В нашето проучване не установихме достоверна разлика по отношение на хемерина между двете основни групи – НАСБ със затлъстяване и предиабет и НАСБ със затлъстяване без въглехидратни нарушения, както и между групите с и без метаболитен синдром. Отсъствието на корелация между серумните нива на хемерина и въглехидратните нарушения в настоящото проучване може да се дължи на изследваната популация, състояща се от пациенти със затлъстяване и НАСБ без изявен ЗД2, както и от сравнително не големия брой изследвани пациенти. Данните в литературата показват, че Хемерин е свързан с НАСБ, затлъстяването и ЗД2, както и някои компоненти на МС, но много от тях остават спорни.

Няколко проучвания съобщават, че чернодробното заболяване може да повлияе нивата на серумния хемерин, като установяват по-високи нива при пациенти с клинично или хистологично доказана НАСБ. Съществуват доказателства, че проинфламаторните цитокини могат да играят роля в освобождаването на хемерин от мастната тъкан, което е установено в експериментални изследвания.

Други изследователи установяват, че хемеринът може да бъде маркер за МС, тъй като експресията му в мастната тъкан се увеличава при пациенти със затлъстяване.

Данните от един мета-анализ показват, че триглицеридите, общия холестерол, ИТМ, обиколката на талията, съотношението талия/ханш и лептинът корелират положително с нивата на хемерина.

В нашето проучване хемеринът корелираше правопропорционално с показателите ИТМ, обиколката на ханша и VAI. По отношение на предиабета, дислипидемията и артериалната хипертония не се установи статистическа значимост с нивата на хемерина. Установено е, че хемеринът корелира с обиколката на талията и обема на мастните клетки, като не може да се намери корелация с кръвното налягане и HOMA-IR. Ние установихме, че хемеринът корелира изразено и правопропорционално с индекса за чернодробна стеатоза и то в групата с предиабет, което показва влияние на въглехидратните нарушения. Не се намери корелация с изследваните показатели за микро- и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия). Не се установява статистическа достоверност по отношение на риска от възникване на предиабет.

В заключение, резултатите от нашето проучване при пациенти със затлъстяване и НАСБ показват връзка между хемерина, стеатозата и затлъстяването, но не с ранните въглехидратни нарушения, МС,

дислипидемията и сурогатните маркери за инсулинова чувствителност и резистентност. Хемерин не корелира с изследваните показатели за микро- и макроангиопатия.

Пентраксин 3

Пентраксин 3 (PTX3) е наскоро идентифициран острофазов реактант, който наподобява CRP както в структурата, така и във функцията, и с който принадлежат към една фамилия. Идентифициарн е също така, като маркер за локално съдово възпаление. Поради това не е изненадващо, че нивата на PTX3 са свързани с нестабилна стенокардия, инфаркт на миокарда, сърдечна недостатъчност и сърдечно-съдова смъртност. Добре известно е, че НАСБ е независим рисков фактор за ССЗ. Серумните концентрации на PTX3 са значително по-високи при пациенти в напредналите стадии на НАСБ, като по-високите нива корелират с тежестта на чернодробна фиброза. Въпреки това, все още не е оценено дали серумните нива на PTX3 са свързани с въглехидратните нарушения при пациенти с НАСБ, както и връзката им с определени параметри за микро-и макрсъсъдови нарушения.

В нашето проучване установихме значимо по-висока средна стойност на серумния PTX3 в групата на лицата с предиабет, което показва, че възпалителните процеси могат да започват още в ранния, предиабетен стадии. Zanetti и сътр. съобщават, че нивата на hs-CRP и PTX-3 са по-високи при пациентите с МС и те твърдят, че това повишение е свързано с възпаление и субклинична атеросклероза. В друго проучване също се установява, че PTX3 е със значително по-високи нива при пациенти с МС, както и че серумните нива на PTX3 се повишават с увеличаването на компонентите на МС.

Нашите резултати показаха, че наличието на хипертония, дислипидемия, метаболитен синдром, както и инсулиновата резистентност не оказват влияние върху нивата на PTX3. Това може да се обясни с 1) сравнително малкия брой изследвани лица и 2) пациентите, бяха без сигнификантна фиброза от изследваните фиброзни скорове, т.е. нямаха напреднала НАСБ, където са характерни по-високите нива на PTX3.

Проведеният анализ за наличието на зависимост между нивата на PTX3 и параметрите индекс глезен мишница, интима медиа дебелина, индекс за периферна невропатия, вибрационен праг, риск за автономна невропатия и индекса за чернодробна стеатоза установи, че PTX3 корелира само с индекса за периферна невропатия.

Това е първото проучване, което оценява връзката между серумните концентрации на PTX3 с микросъдовите параметри при пациенти с НАСБ. Ozturk и сътр. установяват корелация между нивата на PTX3 и атеросклерозата при пациенти с НАСБ. Повишени серумни нива на PTX3 са свързани с наличието на фиброза при пациенти с НАСБ, независимо от компонентите на метаболитния синдром. Авторите предполага, че PTX3 може да се превърне в полезен маркер в разбирането на връзката между фиброзните промени при НАСБ и субклиничната атеросклероза, както и, че наличието на фиброза при пациенти с НАСБ може да бъде рисков фактор за атеросклероза.

Необходими са допълнителни изследвания за по-пълното разбиране на ролята на PTX3 при МС и НАСБ.

В заключение, настоящото проучване показа повишени серумни нива на PTX3 при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет в сравнение с НАСБ със затлъстяване без въглехидратни нарушения. Няма значима разлика в нивата на PTX3 между пациентите с и без

метаболитен синдром. Налице е положителна корелация между PTX3 и индекса за диабетна невропатия.

WISP2

WISP2 е мултитъканен и мултифункционален адипокин с множество изразени клетъчно-специфични ефекти. Данните в литературата за WISP2 са сравнително оскъдни, като основно е изследван в туморогенезата като тумор-супресорен фактор. Счита се, че има протективен ефект при редица злокачествени заболявания, като ролята му в НАСБ и метаболитните нарушения не е достатъчно проучена.

В нашето изследване установихме, че WISP2 корелира слабо и правопропорционално само с индекса за висцерално затлъстяване (VAI) и триглицеридите. Нещо, което е интересно като резултат и което до мемента не е изследавно, е връзката на WISP2 с фиброзните скорове FIB-4 и APRI. Установи се, че WISP2 корелира правопропорционално и умерено по сила с FIB-4 и APRI. Не се установява връзка с предиабета, както и с метаболитния синдром и инсулиновата резистентност. Експерименталните изследвания показват, че WISP2 е в състояние да понижи инсулиновата резистентност, както и да увеличи енергийния разход и не мастната тъкан при миши модели. Авторите свързват тези резултати с факта, че WISP2 е ендогенен растежен фактор предимно от подкожната мастната тъкан, усилващ обаче пролиферацията на мезенхимните прекурсорни клетки, както in vivo, така и in vitro. Нещо, което представлява интерес е, че WISP2 е не само силно експресиран в клетките прекурсори на мастната тъкан, но също така високо е експресиран в мускулните клетки, човешките миобласти, както и в остеобластите. Резултатите ни вероятно са продиктувани от факта, че изследваните пациенти са основно с висцерален тип затлъстяване, докато WISP2 се явява по-скоро като протективен адипокин, който би могъл да понижи инсулиновата резистентност и е с

произход главно от подкожната мастна тъкан. Проведеният анализ за наличието на зависимост между нивата на WISP2 и индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг, риска за автономна невропатия и индекса за чернодробна стеатоза установи, че WISP2 корелира умерено и правопропорционално с индекса глезен-мишница и вибрационнния праг. Това е първото проучване за връзката между WISP2 и показателите за микро- и макросъдови усложнения. Имайки предвид досега установените благоприятни ефекти на WISP2 по отношение на инсулиновата чувствителност и туморогенезата, ние очакваме положителен и протективен ефект и по отношение на атеросклеротичните промени при тези пациенти. Необходими са бъдещи проучвания, които ще проверят тази хипотеза.

В заключение, настоящото проучване установи положителна корелация на WISP2 с фиброзните скорове FIB-4 и APRI, както и с VAI и триглицеридите. От показателите за микро- и макроангиопатия се установи корелация с ABI и VPT. Не се установиха разлики в нивата на WISP2 при пациенти с НАСБ, затлъстяване с и без предиабет, както и при пациенти с и без метаболитен синдром, с и без инсулинова резистентност.

Фибробластен растежен фактор 21

Фибробластен растежен фактор 21 (FGF-21) е хепатокин, който се свързва с редица елементи от „multi-hits theory”в патогенезата на НАСБ, като оксидативен стрес, стрес на ЕПР, митохондриална дисфункция и субклинично хронично възпаление. Участва също така в регулацията на липидния и въглехидратния метаболизъм по инсулин-зависим начин, като се счита, че намалява натрупването на мазнини в черния дроб. От друга

страна съществуват проучвания, които показват сигнификантно покачване на серумните концентрации на FGF-21 при пациенти с диагностицирана НАСБ в сравнение с контроли, като FGF-21 може да се приема за независим предиктор за НАСБ. Нещо повече, някои автори предлагат FGF-21 като неинвазивен биомаркер в диференцирането между обикновената стеатоза и НАСХ заедно с цитокератин-18. Съществуват доказателства за връзката на FGF-21 със ЗД2, МС и инсулиновата резистентност. Голям метаанализ на Wang и сътр. показва повишени нива на FGF-21 при пациенти с изявен ЗД2 в сравнение с контроли, като нивата му корелират с ИТМ, общия холестерол и триглицеридите.

В нашето проучване установихме значимо по-висока средна стойност на FGF-21 при пациенти с НАСБ и предиабет, както и корелация между този показател със съотношението талия/ръст и индекса за висцерално затлъстяване (VAI). Потвърждение на чувствителността на FGF21 от резултатите ни беше, че стойностите му нарастват правопропорционално на тежестта на въглехидратните нарушения. Освен това се установи, че пациентите с метаболитен синдром и инсулинова резистентност имат значимо по-висока средна стойност на FGF-21.

Установихме също така висока предиктивана стойност на FGF-21 по отношение на риска от въглехидратни нарушения, като изчислената прагова стойност ≥ 320 pg/ml се свързва с 4,2 пъти по-висок риск за предиабет спрямо този на пациентите с по-ниски стойности. Бяха открити предиктивни стойности на FGF-21 и по отношение на риска от метаболитен синдром и инсулинова резистентност, като стойности ≥ 270 pg/ml се свързват с 4 пъти по-голям риск за МС и ≥ 260 pg/ml с 3,2 пъти по-голям риск за ИР.

Част от получените резултати съвпадат с резултатите на други студии.

Има съобщения за силно покачване на циркулиращите нива на FGF-21 в хода на ОГТТ, които установяват с кламп техника, че всъщност постпрандиалното повишаване на FGF-21 се обяснява с инсулина, а не с глюкозата.

Ние намерихме също така зависимост на FGF-21 с част от показателите на липидния профил (ТГ и VLDL), както и с ГГТ. В литературата съществуват хипотези, че повишените нива на FGF-21 са всъщност в резултат на изразена резистентност към неговото действие, като тя е връзката с патогенезата на НАСБ/НАСХ.

Нещо повече, авторите предполагат, че повишените нива на FGF-21 вероятно имат протективен ефект срещу липидните и въглехидратните нарушения. Венозното и подкожнато приложение на FGF-21 при експериментални модели и при хора с НАСБ, затлъстяване и ЗД2 води до подобряване на чернодробната стеатоза, редуцира инсулиновата резистентност и кръвната захар на гладно. Тези ефекти се свързват както с подобряване на инсулиновата чувствителност, така и с покачване нивата на адипонектина. Необходими са бъдещи проучвания с цел приложение на FGF-21 в лечението на НАСБ и свързаните метаболитни нарушения, включително ЗД2.

Има проучвания, които установяват връзка между FGF-21 и субклиничната атеросклероза, оценена с интима медиа дебелина при пациенти със ЗД2. Ние анализирахме FGF-21 и в рамките на показателите за микро-и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия), където не открихме корелации, което вероятно е свързано с липсата на сигнификантна атеросклероза при изследваните пациенти, така и с отсъствието на ЗД2. Не установихме и връзка между FGF-21 с изследваните фиброзни скорове използвани при НАСБ, както и с изследваните генетични варианти.

В заключение, резултатите от нашето проучване показаха сигнификантно по-високи нива на FGF-21 при пациенти с предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност. Установи се положителна корелация между FGF-21, ТГ, VLDL и ГГТ, както и с WSR и VAI. По-високите нива на FGF-21 се свързват с повишен риск за предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност. Не се установи корелация с показателите за микро- и макроангиопатия.

Фетуин А

Фетуин А се счита за хепатокин, чийто ген е локализиран в хромозома 3q27, която се приема за локус свързан със ЗД2 и МС. Фетуин А е мултипотентен гликопротеин, който участва в регулацията на костния метаболизъм, миграцията на кератиноцити и в контрола на протеолитичната активност. Също така се счита за биомаркер за невровегетативни заболявания, както и за индикатор за инсулинова резистентност, сърдечносъдов риск, ендотелна дисфункция и субклинична атеросклероза. Съществуват доказателства за връзката между фетуин А, затлъстяването, инсулиновата резистентност и НАСБ. Няколко студии демонстрират сигнификантно по-високи нива на фетуин А при пациенти с хистологично потвърдена НАСБ.

В нашето проучване не установихме разлика в нивата на фетуин А в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Не се установи разлика в нивата при пациентите с и без метаболитния синдром, със и без инсулиновата резистентност. Не открихме и корелации с нивата на показателите от липидния профил, чернодробните ензими и антропометричните показатели. Съществуват доказателства за връзката на фетуин А със ССЗ, независимо от познатите рискови фактори като артериална хепертония и тютюнопушене, като повишените нива се

свързват с повишен риск за миокарден инфаркт и мозъчен инсулт. Ние анализирахме фетуин А в рамките на показателите за микро-и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, риска за автономна невропатия, индекса за периферна невропатия и вибрационния праг), където се установи слаба корелация с индекса глезен мишница (ABI).

В заключение, резултатите от нашето проучване показаха корелация на фетуин А с индекса глезен мишница (ABI). Не се установиха разлики в нивата на фетуин А в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Не се установи разлика в нивата при пациентите с и без метаболитен синдром, с и без инсулинова резистентност.

Ангиопоетин-свързан растежен фактор

Ангиопоетин-свързаният растежен фактор (AGF) се секретира предимно от черния дроб и е идентифициран от Oike и сътр. през 2003 година. Авторите установяват, че при експериментални модели мишки ниските нива на AGF се свързват със затлъстяване, инсулинова резистентност и натрупване на липиди в черния дроб и скелетната мускулатура. Установяват също така, че свръхекспресията на AGF чрез аденовирусна трансдукция се свързва с повишаване на циркулиращите нива на AGF. Този хепатокин се счита, че има важна функция в липидния и въглехидратния метаболизъм и вероятно е протеин, който намалява инсулиновата резистентност и затлъстяването. Установявено е, че серумните концентрации на AGF са сигнификантно повишени при пациенти със ЗД2 в сравнение с не-диабетици.

В нашето проучване не намерихме разлика в нивата на AGF в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Съществуват данни в литературата за повишени нива на AGF при пациенти с МС в сравнение с контроли, както и че МС е предиктор за серумните му нива. Ние не установихме разлика в нивата при пациентите с и без МС, с и без ИР. Не открихме и корелации с показателите от липидния профил и чернодробните ензими. От антропометричните показатели се установи корелация между AGF и съотношението талия/ханш. От анализа, който направихме на AGF в рамките на показателите за микро- и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, риска за автономна невропатия и вибрационния праг) също не баха открити корелации, както и с двата изследвани генетични варианта. Не съществуват публикувани данни за пряката роля в НАСБ, но по отношение на въглехидратния метаболизъм се счита, че AGF потиска глюкозната продукция в хепатоцитите чрез намаляване на експресията на глюкозо-6-фосфатазата.

In vitro проучвания демонстрират намаляване на чернодробната глюкозна продукция след лечение с AGF, което показва, че може да намери приложение като нов терапевтичен таргет при пациенти с ЗД2, затлъстяване, МС, както и с НАСБ. Бъдещи проучвания в тази насока ще покажат дали това е възможно.

В заключение, резултатите от нашето проучванене не установиха разлики в нивата на AGF в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Не установихме разлика в нивата при пациентите с и без метаболитен синдром, с и без инсулинова резистентност. Не бяха открити корелации с изследваните показатили за микро- и макроангиопатия, както и с генетичните мутации. Налице е корелация с параметъра талия/ханш (WHR).

Секс-хормон свързващ глобулин

Секс-хормон свързващ глобулин (SHBG) се произвежда основно от черния дроб и основната му роля е свързана с транспорта на половите хормони, но притежава и редица други функции. Той се свързва с глюкозната обмяна, затлъстяването и компонентите на метаболитния синдром. В проучване проведено при постменопаузални жени с хистологично доказана НАСБ са установени по-ниски концентрации на този хепатокин в сравнение с контроли, като също така е установена връзка между серумните му нива с НАСБ независимо от възрастта, ИТМ и обиколката на талията. Също така понижени нива на SHBG при НАСБ са намерени и при пациенти със ЗД2.

В нашето проучване не установихме разлика в нивата на SHBG в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Установихме обратнопропорционална корелация с обиколката на талията, съотношението талия/ханш, както и с инсулина на 60 мин. от ОГТТ. Някои поручвания докладват понижаване на серумните концентрации на SHBG с увеличаването на чернодробното мастно съдържание, както и че промяната в начина на живот и редукцията на тегло водят до покачване на нивата му. Тези резултати не се потвърждават от всички студии. Установена е обратнопропорционална корелация между SHBG, гликирания хемоглобин, кръвната захар на гладно и триглицеридите, както и позитивна корелация с HDL при мъже с МС. Ние не намерихма връзка с МС и неговите компоненти, както и с ИР и с изчислените фиброзни скорове. Не се установи връзка с нивата на SHBG и с изследваните генетични варианти. Не се установи и разлика също така при пациентките с и без менопауза.

В заключение, резултатите от нашето проучване показаха обратнопропорционална корелация на SHBG с обиколката на талията, съотношението талия/ханш, както и с инсулина на 60 мин. от ОГТТ. Не се установиха разлики в нивата на SHBG в двете основни групи, както и връзка с предиабета, метаболитния синдром, инсулиновата резистентност и с изчислените фиброзни скорове. Не се установи връзка с нивата на SHBG и с изследваните генетични варианти.

Резултатите, които получихме за фетуин А, AGF и SHBG вероятно са продиктувани от сравнително близката метаболитна характеристика на основните групи пациенти в проучването, като всички участниците са със затлъстяване и НАСБ, което се оказва може би по-силен предиктор за тези хепатокини в сравнение с въглехидратните нарушения и метаболитния синдром като цяло. Необходими са бъдещи проучвания с участието на различни групи лица за уточняване и разбиране на ролята на тези хепатокини в патогенезата на НАСБ и връзката им с метаболитните нарушения.

PNPLA3 и TM6SF2

Различни гени и генни мутации са във фокуса на НАСБ през последните десет години, като усилено се изследва тяхната функция и роля в развитието и прогресията до НАСХ, фиброза, цироза и хепатоцелуларен карцином. До момента съществуват множество доказателства за тяхното независимо от метаболитните рискови фактори значение за НАСБ, които обаче се опровергаха от няколко големи кохортни проучвания с участието на над 15 хиляди души.

Ние изследвахме за първи път сред българска популация двата най-чести варианта на гените PNPLA3 и TM6SF2, свързани с развитието и

прогресията на НАСБ, а именно PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K. Честотата на хетерозиготните варианти при PNPLA3, както и честотата на хетерозиготните варианти в TM6SF2, които открихме не се отличава съществено от резултатите получени при други големи проучвания сред европейската раса с известна разлика по отношение на хомозиготните варианти при PNPLA3, където установихме по-ниска честота. Резултатите показаха сигнификантна зависимост между генетичните промени и въглехидратните нарушения. При PNPLA3, процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази със затлъстяване без въглехидратни нарушения, статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. При TM6SF2 също процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с предиабет, а в тази без предиабет - статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. Palmer и сътр. установяват за първи път в две големи проучвания, че PNPLA3 I148M вариант е свързан с инсулинова резистентност и повишен риск за ЗД2 при голяма кохорта със затлъстяване, въпреки относително по-ниските серумни триглицериди.

В нашето проучване за първи път се установи, че при хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена PNPLA спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на предиабет е **9,6 пъти** по-висок. При хетерозиготните варианти на гена TM6SF2 спрямо нормални хомозиготи, рискът за възникване на предиабет е **3,9 пъти** по-висок. Скорошен мета-анализ на 65 изследвания установи, че полиморфизмът на PNPLA3 rs738409 не е само фактор свързан с риска от НАСБ, но и с възможността за прогресия на заболяването. Асоциацията на варианта I148M с чернодробното липидно съдържание е свързана с участието и на други рискови фактори, като висцерално затлъстяване, повишен прием на захари

или омега-6 полиненаситени мастни киселини, както и други генетични фактори.

Установихме връзка между генетичните промени и метаболитния синдром и неговите компоненти, като при PNPLA3, процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. При TM6SF2 също процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с МС, а в тази без МС статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи.

Нещо повече, при хомозиготните и хетерозиготните варианти на гена PNPLA3 спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на метаболитен синдром е 3 пъти по-висок. При хетерозиготните варианти на гена TM6SF2 спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на метаболитен синдром е 8,4 пъти по-висок. Cui et al. изучават голям брой гени и техните ефекти върху НАСБ и МС, като констатират, че от 44% от гените асоциирани с НАСБ почти 14% от тях са свързани и със ЗД2, затлъстяване и хипертония едновременно. Съществуват противоречиви резултати в досегашните проучвания по отношение на PNPLA3 I148M и връзката му с липидните нарушения. Проучване с италиански и британски пациенти с НАСБ показва, че генотиповете на GG и CG се свързват с по-висок LDL и по-нисък HDL холестерол.

Други проучвания установявт понижени нива на ТГ при носителите на патологичния G алел. Нашето проучване не установи връзка между генетичните промени на PNPLA3 и отделните параметри на липидния профил (общия холестерол, HDL, LDL, триглицериди и VLDL), за разлика от TM6SF2 E167K варианта, където хетерозиготите по патологичния алел имат значимо по-високи средни стойности на показателите VLDL и ТГ. От друга страна нормалните хомозиготи имат статистически достоверно по-висока средна стойност на HDL. Ние също така установихме

сигнификантна зависимост между генетичните промени и показателя дислипидемия. При PNPLA3 процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с дислипидемия, а в тази без дислипидемия - статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. При TM6SF2 различията имат идентичен характер. Интересни резултати се установеха при изследването на чернодробните ензими. Най-високи нива на АСТ, АЛТ и ГГТ се установиха при хомозиготните варианти при PNPLA3 за разлика от хетерозиготните варианти и нормалните хомозиготи. При TM6SF2 разлика в нивата на трансаминазите не бе открита между вариантите на гена и дивия алел, като показателите бяха в нормални стойности и при двете групи. Тези резултати се подкрепят от редица проучвания. Връзката между I148M варианта с повишените нива на чернодробните еними и по-специално с АЛТ за първи път се описват в *Genome-wide association study (GWAS)*. Тези резултати се потвърждават и в голям метаанализ, където се описва сигнификантна връзка между rs738409 варианта с повишени нива на АЛТ. По отношение на връзката между генетичните промени и инсулиновата резистентност установихме сигнификантна зависимост с генетичните промени само при PNPLA3 I148M варианта. Процентът на хетерозиготните варианти е значимо по-голям в групата с ИР, а в тази без ИР- статистически достоверно по-висок е относителният дял на нормалните хомозиготи. Рискът от инсулинова резистентонст при носителите на този алел е 2,1 пъти по-висок в сравнение с нормалните хомозиготи. Анализът на връзката между изследваните генетични полиморфизми и фиброзните скорове установи значимо по-високи стойности на FIB-4 и APRI при хомозиготните и хетерозиготните носители на патологичния алел на PNPLA3 спрямо нормалните хомозиготи. Анализът на връзката между генетичните нарушения и показателите за микро- и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния

праг и риска за автономна невропатия) не установи значими разлики при пациенти с и без генетични промени. Необходими за бъдещи проучвания с по-голям брой изследвани пациенти за потвърждаване на тези резултати.

В заключение, това е първото за България генетично проучване при пациенти с НАСБ, затлъстяване и предиабет, при което се установява връзка между генетичните промени в изследваните от нас гени PNPLA3 и TM6SF2 и метаболитните нарушения, включващи предиабет, метаболитен синдром, дислипидемия и инсулинова резистентност. Установехме също така, че лицата носители на тези генетични полиморфизми имат повишен риск за развитие на предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност.

Макар и до голяма степен в теоретичен етап на развитие, регулирането на PNPLA3 I148M дава обещание като реална възможност за терапевтична интервенция. По-нататъшното усъвършенстване на познанията ни относно генетичните нарушения и тяхната връзка с външните фактори, както и със съпътстващите метаболитни отклонения има потенциала да промени начина, по който се грижим за пациентите с НАСБ, с персонализиран подход към тяхното наблюдение, съобразен с индивидуалния риск за прогресия на фиброзата и лечение, насочено към основните механизми на болестта. Необходими са бъдещи проспективни проучвания за потвърждаване на получените резултати в по-големи групи пациенти.

В обобщение на резултатите от проведените изследвания съставихме алгоритъм, който да се използва в клиничната практика за ранна диагноза на НАСБ и отдиференциране на пациентите с метаболитни рискови фактори с висок риск за наличие или развитие на НАСХ с клинично значима фиброза, цироза и ХЦК, и обратно разкриване на метаболитни нарушения при НАСБ.

I. Метаболитни рискови фактори, свързани с първична НАСБ:

А. Метаболитен синдром /повишени триглицериди

Б. ЗД2 или предиабет (нарушена гликемия на гладно (НГГ) и/или нарушен въглехидратен толеранс (НВТ)

В. Инсулинова резистентност (HOMA-IR>2.5)

Г. Затлъстяване / абдоминално затлъстяване

При всяко лице с наличие на 1 или повече метаболитни рискови фактори:

Скрининг

1. ***Първа стъпка*: Откриване на НАСБ сред болни с метаболитни рискови фактори**
2. ***Втора стъпка*: Откриване на болни с прогресивно заболяване и лоша прогноза (тежък НАСХ с клинично значима фиброза, цироза и риск за ХЦК)**

1. Откриване на НАСБ сред болни с метаболитни рискови фактори

- Анамнеза, физикален преглад: алкохол, прием на медикаменти, известни чернодробни заболявания
- анти-HCV и HbsAg
- Чернодробните ензими (АСТ, АЛТ и ГГТ)
- Абдоминална ехография - първо средство на избор за диагноза
- При невъзможност за извършването й - Консултация с гастроентеролог – за потвърждаване на НАСБ и изключване на друго чернодробно заболяване

1.1. Без стеатоза и нормални чернодробни ензими

Проследяване с изследване за НАСБ (абдоминална ехография, чернодробни ензими):

- На 3 - 5г. при възраст < 40 г., ИТМ < 30, липса на ЗД 2 и разгърнат МС
- По-често при наличие на един или повече от горепосочените параметри и при задълбочаване на метаболитните отклонения
- Промяна в начина на живот, лечение на метаболитните отклонения /заболявания
- Проследяване – ОПЛ, ендокринолог

1.2. Стеатоза (НАСБ)

При всеки болен със стеатоза следва стъпка 2

2. Оценка на риска за прогресивно заболяване и лоша прогноза (тежък НАСХ с клинично значима фиброза, цироза и риск за ХЦК)

- Серумни маркери / скорове за НАСБ-фиброза: FIB-4 (> 35 г.) и NFS (задължителни), APRI (по-ниска предсказваща стойност), ELF (при възможност)
- Еластография (при възможност)
- Генетично изследване - полиморфизъм на PNPLA3 с или без TM6SF2
- **Минимален набор**: FIB-4 и NFS и консултация с гастроентеролог

2.1. Стеатоза без повишени ензими

2.1.1. Нисък риск

- Възраст <40 г.; ИТМ < 30, липса на ЗД 2 и разгърнат МС

- FIB-4 ≤1.3 (≤2.0 >65 г.) и/или NFS < -1.455 и/или APRI <0.5 и/или ELF <7.7
- Еластография *(FibroScan)* < 8 kPa (M probe) или < 7.2 kPa (XL probe)
- Носителство на нормални гени PNPLA3 (CC) и TM6SF2 (CC)
- Проследяване на ензими и фиброзни биомаркери през 2 или 3 г. , съобразно наличието на някои рискови фактори или липса на всички рискови фактори или при задълбочаване на метаболитните отклонения
- Проследяване от ОПЛ и ендокринолог, гастроентеролог – при необходимост и за изключване на друго чернодробно заболяваве
- Лечение – промяна в начина на живот, корекция на метаболитните отклонения /заболявания

2.1.2 Умерен и висок риск

- Възраст >40 г., ИТМ > 30, ЗД 2 и разгърнат МС
- АСТ > АЛТ, тромбоцити < 150 G/l
- FIB-4 >1.3 (>2.0 >65 г.) и/или NFS > -1.455 и/или APRI >0.5 и/или ELF >7.7
- Еластография *(FibroScan)* ≥ 8 kPa (M probe) или ≥ 7.2 kPa (XL probe)
- PNPLA3 и/или TM6SF2 носителство на рисковата мутация - PNPLA3 I148M (CG и GG) и/или TM6SF2 E167K (TT и CT)
- Консултация с гастроентеролог – показана е чернодробна биопсия
- Лечение: Промяна в начина на живот, лечение на метаболитните отклонения /заболяванияе, НАСБ-насочена терапия – след чернодробна биопсия
- Проследяване – мултидисциплинарен екип – гастроентеролог и ендокринолог, други специалисти - при необходимост

2.2. Стеатоза с повишени ензими

- Консултация с гастроентеролог за: задълбочена оценка на тежестта на чернодробното заболяване; изключване на друго чернодробно заболяване, показана е чернодробна биопсия или друго изследване, потвърждаващо цироза, варици на хранопровода или ХЦК, лечение
- Проследяване – гастроентеролог, ендокринолог, други специалисти - мултидисциплинарен подход

II. Разкриване на метаболитни нарушения при НАСБ

При всяко лице с НАСБ:

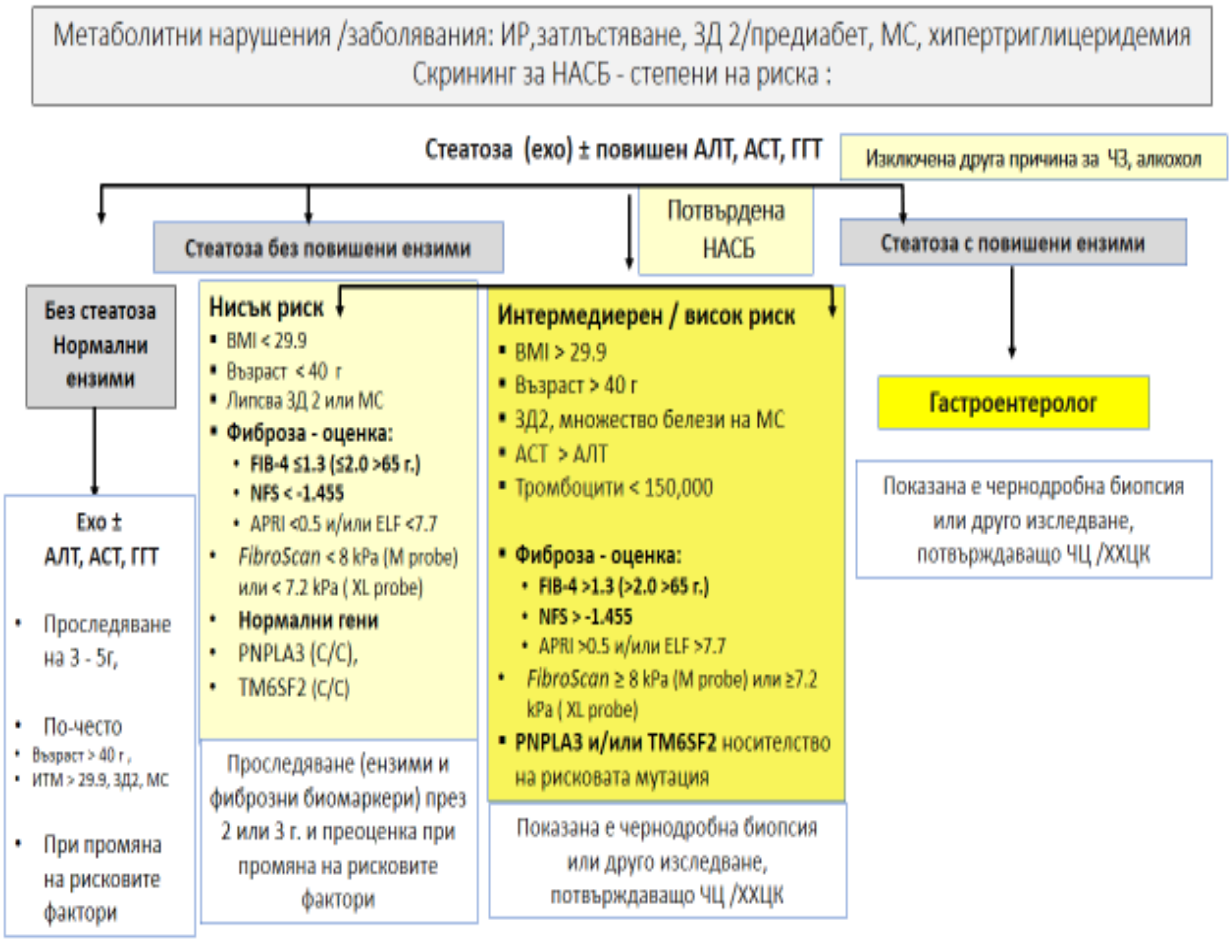
Скрининг за откриване на метаболитни рискови фактори / заболявания сред пациентите с НАСБ

1. Затлъстяване, абдоминално затлъстяване, артериална хипертония: ИТМ, коремна обиколка, измерване на артериално налягане и анамнестични данни за прием на антихипертензивни лекарствени средства
2. Инсулинова резистентност: инсулин, (HOMA-IR>2.5)
3. ЗД2 или предиабет (нарушена гликемия на гладно (НГГ) и/или нарушен въглехидратен толеранс (НВТ): глюкоза на гладно, ОГТТ, HвA1c, анамнестични данни за прием на антидиабетни лекарствени средства
4. Дислипидемия: общ холестерол, HDL, LDL холестерол, триглицериди, анамнестични данни за прием на антилипемични лекарствени средства
5. Метаболитен синдром
6. При липса на въглехидратни нарушения: определяне на рискови биомаркери (при възможност) за профилактика на предиабет при болни с НАСБ

При наличие на едно или повече метаболитно/и нарушение/я или заболяване/я:

- Консултация с ендокринолог – диагноза, лечение
- Профилактика, проследяване и лечение (промяна в начина на живот, корекция на метаболитните нарушения, НАСБ – насочена терапия (при необходимост)– мултидисциплинален екип

  Схематично практическият алгоритъм за ранна диагноза и профилактика на метаболитните отклонения при НАСБ е представен на **фиг. 4**



Фиг. 4 Практически алгоритъм за ранна диагноза и профилактика на МС, предиабета и НАСБ – мултидисциплинарен подход

Изводи

1. Серумните нива на RBP4 при НАСБ със затлъстяване са по-високи при наличие на предиабет, МС и дислипидемия. Стойности на RBP4 ≥ 61 mcg/ml се свързват с **3,5 пъти** по-висок риск за предиабет и ≥ 55 mcg/ml с **3,1 пъти** по-висок риск за МС.
2. Серумните нива на Лумикан при НАСБ със затлъстяване са по-високи при наличие на предиабет и метаболитен синдром. При стойности на лумикан ≥ 0,07 ng/ml спрямо тези с по-ниски, рискът за предиабет е **3,9 пъти** по-висок.
3. Серумните нива на Хемерин не се повлияват от наличието на предиабет и метаболитен синдром при лица с НАСБ и затлъстяване. Хемерин корелира с чернодробната, общата и висцерална мастна тъкан (HSI, ИТМ, ханш и VAI).
4. Серумните нива на PTX3 при НАСБ със затлъстяване са по-високи при наличие на предиабет. Не бе установена разлика в нивата на PTX3 между пациентите с и без метаболитен синдром, но той корелира с индекса за периферна невропатия.
5. WISP2 корелира с показателя за висцерална мастна тъкан (VAI) и нивата на триглицеридите, както и с ABI и VPT. Не се установява разлика в нивата на WISP2 при пациенти с НАСБ със затлъстяване с и без предиабет, с и без метаболитен синдром.
6. Серумните нива на FGF21 при НАСБ със затлъстяване нарастват допълнително при наличие на предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност. FGF21 корелира с VAI, ТГ, VLDL и ГГТ. Стойности ≥ 320 pg/ml се свързват с **4,2 пъти** по-висок риск за

предиабет, ≥ 270 pg/ml с **4 пъти** по-висок риск за метаболитен синдром и ≥ 260 pg/ml с **3,2 пъти** по-висок риск за инсулинова резистентност.

7. Нивата на хепатокините Фетуин А, AGF и SHBG не се влияят от въглехидратните нарушения и не корелират с компонентите на метаболитния синдром, фиброзните скорове и показателите за микро- и макроангиопатия при пацииенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
8. Изследваният полиморфизъм на ген PNPLA3 I148M показва връзка и се явява рискова генетична мутация не само за НАСБ, но и за предиабет, метаболитен синдром, дислипидемия и инсулинова резистентност. Лицата носители на този полиморфизъм имат **9,6 пъти** по-висок риск за предиабет, **3 пъти** по –висок риск за метаболитен синдром и **2,1 пъти** по-висок риск за инсулинова резистентност.
9. Изследваният полиморфизъм на ген TM6SF2 E167K показва връзка и се явява рискова генетична мутация не само за НАСБ, но и за предиабет, метаболитен синдром и дислипидемия. Лицата носители на този полиморфизъм имат **3,9 пъти** по-висок риск за предиабет и **8,4 пъти** по-висок риск за метаболитен синдром.

Справка за приносите

I. Според приоритетния си характер приносите могат да бъдат разгледани като такива

<u>В световен мащаб:</u>

1. За първи път се изследват двата основни генетични варианта участващи в развитието и прогресията на НАСБ PNPLA3 I148M и TM6SF2 E167K и връзката им с пълния спектър на метаболитния синдром, с нови биомаркери асоциирани с НАСБ, както и с основни показатели за микро- и макроангиопатия.
2. За първи път се изследват адипокините WISP2, PTX3, Хемерин и Лумикан при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
3. За първи път се анализират биомаркерите RBP4, Лумикан, Хемерин, WISP2 и FGF 21 с показателите за микро- и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационния праг и риска за автономна невропатия) при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.

В национален мащаб:

1. Проведено е първото до момента в България генетично изследване при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предибет.
2. За първи път се изследват нивата на RBP4, Лумикан, Хемерин, PTX3, WISP2, Ангиопоетин свързан растежен фактор, Фибробластен растежен фактор 21 и SHBG при пациенти с НАСБ, затлъстяване и предиабет.
3. Предложени са прагови стойности за RBP4, които се свързват с повишен риск за предиабет и за метаболитен синдром при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
4. Предложени са прагови стойности за Лумикан, които се свързват с повишен риск за предиабет при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
5. Предложени са прагови стойности за Фибробластен растежен фактор 21, които се свързват с повишен риск за предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
6. За първи път се предлагат хепатокини като потенциални биомаркери за оценка на индивидуалния метаболитен риск.

II. Съобразно значимостта си в научно-теоретичен или клинично-приложен аспект приносите могат да бъдат систематизирани като

Приноси с научно-теоретичен характер:

1. Проведено е първото до момента в България генетично изследване при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предибет.
2. Изследвана е широка гама от хепатокини, адипокини и матриксни протеини (RBP4, Лумикан, Хемерин, PTX3, WISP2, SHBP, Фетуин А, AGF и FGF 21) при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
3. Изследвана е честотата и връзката на генетичните промени с основните метаболитни нарушения при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
4. Сравнени са стойностите на основни фиброзни скорове с изследваните хепатикини, адипокини, както и с генетичните промени.
5. Оценени са параметрите за микро-и макроангиопатия при лица с НАСБ със затлъстяване и предиабет.

Приноси с приложен характер:

1. Направени са препоръки за провеждане на генетични изследвания при високо рискови пациенти с установена стеатозна болест и метаболитен синдром с/без предиабет с оглед ранна превенция и оценка на риска от прогресия на НАСБ до НАСХ, цироза и хепатоцелуларен карцином.

2. Предложени са прагови стойности за RBP4, които се свързват с повишен риск за предиабет, както и за МС при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
3. Предложени са прагови стойности за Лумикан, които се свързват с повишен риск за предиабет при пациенти с НАСБ със затлъстяване и предиабет.
4. Предложени са прагови стойности за Фибробластен растежен актор 21, които се свързват с повишен риск за предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност при пациенти с НАСБ и затлъстяване.
5. Предложен е алгоритъм за оценка на риска за НАСБ и метаболитни нарушения, базиран на изследваните органокини и генетични полиморфизми.

Публикации по темата на дисертацията

Статии в чужди списания с IF

1. **Karamfilova V** , Gateva A, Alexiev A, Zheleva N, Velikova T, Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Cherkezov N, Kamenov Z, Mateva L. The Association between Non-alcoholic fatty liver disease, Retinol-binding protein 4 and micro- and macro-vascular changes in obese patients with or without prediabetes. Arch Physiol Biochem. 2019; 7:1-6.**IF = 2.110**
2. **Karamfilova V**, Gateva A, Assyov Y, Alexiev A, Savov A, Yaneva N, Ivanova I , Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Mateva L, Kamenov Z. PNPLA3 I148M Polymorphism in Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes. J Gastrointestin Liver Dis. 2019;28(4):433-438.**IF=2.063**
3. Gateva A, Kamenov Z, **Karamfilova V**, Assyov Y, Velikova T, El-Darawish Y, Okamura H. Higher levels of IL-18 in patients with prediabetes compared to obese normoglycaemic controls. Arch Physiol Biochem. 2019;11:1-4. **IF = 2.110**
4. Naydenov S, Vasileva D, Manov E, Vasilev D, **Karamfilova V**, Runev N. Is it worth evaluating the coronary calcium score in patients with premetabolic and metabolic syndrome? Acta Medica Mediterranea. 2019; 35: 1879 **IF = 0.835**

Статии в реферирани български списания

1. **В. Карамфилова**. Метаболитни промени и цитокини при неалкохолната стеатозна болест. Мединфо-Кардиология, Ендокринология и Неврология 2019, 9: 80-83.
2. **В. Карамфилова**. Затлъстяване и неалкохолна стеатозна болест. JP news. 2019, 9:18-20.

Участия в научни форуми

1. **В. Карамфилова.** Метаболитни аспекти на неалкохолната стеатозна болест. Доклад на IV Национален конгрес за млади гастроентеролози 29.03.2018 г., София
2. **В. Карамфилова**, Л. Матева, З. Каменов. Предиабет при лица с НАСБ и затлъстяване част от "Микро- и макросъдови промени при неалкохолната стеатозна болест с или без нарушения във въглехидратната обмяна" Доклад на IV Национален симпозиум по хепатология, Ноември 2018 г., София.
3. **Karamfilova V** , Gateva A, Alexiev A, Zheleva N, Velikova T, Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Cherkezov N, Kamenov Z, Mateva L. The association between retinol-binding protein 4 and prediabetes in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease *Endocrine Abstracts* (2019) **63** P1012 | DOI: 10.1530/endoabs.63.P1012.

   21 Европейски конгрес по ендокринология, май 2019, Лион, Франция постер
4. **В. Карамфилова,** Л. Матева, З. Каменов. Неалкохолна стеатозна болест, затлъстяване и метаболитен синдром. Доклад на V Национална конференция на БЛС 24-26 октомври 2019 г, Несебър.

Участия в научни проекти

1. Конкурс „ГРАНТ-2017” на МУ-София ДОГОВОР № Д-114/02.05.2017 г. за финансиране на изследователски ПРОЕКТ с вх. № 8516/12.12.2016 г.на тема: „Микро- и макросъдови промени при неалкохолната стеатозна болест с или без нарушения във въглехидратната обмяна.“
2. Конкурс „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения -2017” на МУ-София ДОГОВОР № Д - 233/15.12.2017 г. за финансиране на изследователски ПРОЕКТ с вх. № 4728/19.07.2017 г.на тема: „Нови биохимични, генетични и клинични маркери за оптимизиране на диагностиката и мониторирането на неалкохолната стеатозна болест при пациенти със затлъстяване и предиабет.“
3. Конкурс „Млад изследовател-2019” на МУ-София ДОГОВОР № Д121/23.04.2019 „Хепатокини и тяхната връзка с неалкохолната стеатозна болест и метаболитния синдром при пациенти със затлъстяване и предиабет“.