



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Д-р Деница Руменова Кофинова

ОЦЕНКА НА ФИБРОЗАТА
ПРИ ХРОНИЧНИ ЧЕРНОДРОБНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ
В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“

Шифър 7.1.

Професионално направление: „Медицина“

Научна специалност: „Педиатрия“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Доц. Христо Желев Желев, дм

Доц. Даниела Мирчева Авджиева-Тзавелла, дм

СОФИЯ 2020

СЪДЪРЖАНИЕ

СЪДЪРЖАНИЕ.....	2
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА КИРИЛИЦА.....	5
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА ЛАТИНИЦА.....	6
УВОД.....	7
I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	8
1. Хронични чернодробни заболявания.....	8
2. Чернодробна биопсия.....	9
3. Ехография.....	11
4. Ултразвукова еластография.....	11
4.1 Strain еластография.....	12
4.2 Shear-wave еластография.....	12
4.2.1 Transient еластография.....	13
4.2.2 Supersonic shear-wave еластографията.....	14
5. Еластография при хронични вирусни хепатити.....	16
6. Еластография при неалкохолна мастна чернодробна болест.....	18
7. Еластография при муковисцидоза.....	20
8. Еластография при болест на Уилсън.....	20
9. Еластография при билиарна атрезия.....	22
10. Еластография за проследяване усложненията на цироза.....	23
11. Еластография при чернодробна трансплантация.....	23
12. Кръвни маркери за определяне на фиброза.....	24
12.1 АЛАТ.....	25
12.2 АСАТ/АЛАТ.....	26
12.3 APRI.....	26
12.4 FIB-4.....	26
12.5 FibroTest-ActiTest.....	29
12.6 FibroMax.....	30
12.7 ELF.....	30
12.8 PNFI.....	30
12.9 PNFS.....	30
13 Генетични полиморфизми при НАМЧБ.....	31
13.1 PNPLA3 I148M.....	31
13.1.1 PNPLA3 I148M и НАМЧБ.....	33

13.1.2 PNPLA3 и хроничен вирусен В и С хепатит.....	35
13.1.3 PNPLA3 и алкохолна чернодробна болест.....	35
13.1.4 PNPLA3 и други заболявания.....	36
13.2 TM6SF2.....	36
13.2.1. TM6SF2 E167K и НАМЧБ.....	37
13.2.2. TM6SF2 E167K и сърдечно-съдови заболявания.....	39
13.3.3. TM6SF2 E167K и хронични вирусни хепатити.....	39
13.3.4 TM6SF2 E167K и алкохолна чернодробна болест.....	40
13.3 GSKR P446L.....	40
14. Заключение.....	43
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	46
1. Цел.....	46
2. Задачи.....	46
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	46
1. Дизайн на проучването.....	46
2. Материали и методи.....	46
2.1 Клиничен материал.....	46
2.2 Биологичен материал.....	48
2.3 Методи за уточняване на диагнозата в отделните групи.....	48
2.3.1 Параклинични методи.....	49
2.3.2 Образни методи.....	50
2.4 Методи за оценка на фиброзата.....	50
2.4.1 Инвазивни методи за оценка на фиброзата.....	52
2.4.2 Неинвазивни методи за оценка на фиброзата.....	54
2.5 Изследване на генетичните полиморфизми в гените PNPLA3, GSKR и TM6SF2..	52
2.6 Статистически методи.....	58
IV. Резултати.....	59
1. Задача 1, 2 и 3.....	59
2. Задача 4.....	72
3. Задача 5.....	74

4. Задача 6.....	78
5. Задача 7.....	80
V. ОБСЪЖДАНЕ.....	99
1. Значение на 2D-SWE в детска възраст.....	101
2. Фактори, които влияят върху 2D-SWE в детска възраст.....	104
3. Значение на кръвните маркери.....	119
4. Значение на генетичните полиморфизми за развитието на НАМЧБ.....	119
VI. ИЗВОДИ.....	109
VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
VIII. АЛГОРИТМИ.....	111
IX. ПРИНОСИ.....	113
X. СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ.....	113
XI. СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ.....	118
XII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	121
XIII. БИБЛИОГРАФИЯ.....	123
XIV. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	143
БЛАГОДАРНОСТИ.....	147

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА КИРИЛИЦА

АЛАТ - Аланин аминотрансфераза

АФ – Алкална фосфатаза

АЛАТ – Аланин аминотрансфераза

АСАТ - Аспартат аминотрансфераза

ГГТ - Гамаглутамил трансфераза

ИКМ - Извънклетъчен матрикс

НАМЧБ - Неалкохолна мастна чернодробна болест

НАСХ - Неалкохолен стеатохепатит

МРЕ - Магнитно резонансната еластография

ТГ - Триглицериди

ХЧЗ - Хронични чернодробни заболявания

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА ЛАТИНИЦА

2D-SWE – Two Dimensional Shear-wave Elastography

ARFI - Acoustic Radiation Force Impulse Elastography

AUC – Area Under the Curve

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

ELF - Enhanced Liver Fibrosis

ESPGHAN - European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

FIB-4 – Fibrosis-4 Index

GCKR P446L - Glucokinase regulatory protein

HBV – Hepatitis B Virus

HCV – Hepatitis C Virus

HDL-C – High-density lipoprotein cholesterol

HIV- Human immunodeficiency virus

LDL-C – Low-density lipoprotein cholesterol

PNPLA3 I148M - Patatin-like phospholipase domain containing 3 protein

pSWE – point Shear-wave Elastography

rtSWE - Real-time Shear-wave elastography

ROC - Receiver Operating Characteristic

SD - Standard deviation

SDS - Standard deviation score

SSWE- Supersonic Shear-wave Elastography

TE - Transient elastography

TM6SF2 E167K - Transmembrane 6 superfamily member 2

УВОД

Златен стандарт за определяне степента на чернодробната фиброза както при възрастни, така и при деца, е извършването на чернодробна биопсия. Манипулацията е инвазивна, крие рискове от усложнения, в детска възраст се извършва задължително под анестезия, освен това е травмираща за децата и техните родители. При възрастните в последните години навлязоха и се утвърдиха неинвазивни методи, неизискващи чернодробна хистология, за оценка на фиброзата. Тези методи включват както образни техники, ултразвукова и магнитно-резонансна еластография, така и различни кръвни маркери. Проучва се и ролята на определени генетични полиморфизми за по-бързото развитие на фиброза и стеатоза при предразположени индивиди. Докато при възрастните вече има утвърдени препоръки за извършване на изследванията и норми, то при децата липсват такива. Това налага извършването на собствени проучвания и валидиране на стойности с оглед рутинно прилагане на неинвазивни методи за оценка на чернодробната фиброза при проследяването на деца с хронични чернодробни заболявания.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Оценка на чернодробната фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст

1. Хронични чернодробни заболявания

Хроничните чернодробни заболявания, независимо от етиологията си, се характеризират с продължаващ повече от 6 месеца възпалителен процес и възможност за необратимо чернодробно увреждане. Чернодробната цироза от гледна точка на хистологичните промени представлява дифузно разрастване на фиброзна тъкан с образуване на регенераторни възли. Независимо от вида на увреждащата нокса, черният дроб реагира по един и същ начин - чрез програмирана клетъчна смърт (апоптоза), некроза и фиброгенеза. В основата на тези процеси стоят оксидативният стрес, освобождаването на цитокини и други разтворими растежни фактори, което води до активация на чернодробните stelatни клетки и фиброобразуване. Последващото формиране на фиброза и регенераторни възли довежда до образуване на съдови анастомози. Те повишават резистентността към порталния кръвоток и причиняват порто-системни шънтове.

Проучвания при животни и биопсичен материал от черен дроб на възрастни и деца с чернодробни заболявания показват характерни модели на фиброобразуване в зависимост от етиологията. Различни видове клетки участват във фиброобразуването. Чернодробните stelatни клетки се активират при хепатоцелуларна увреда, докато порталните миофибробласти и фибробласти - при увреда в порталните пространства. Например хроничните вирусни хепатити се характеризират с перипортална фиброза, а токсичното/метаболитното увреждане с центрилобуларна фиброза. Билиарната фиброза е характерна за вродената чернодробна фиброза и билиарната атрезия.

Значителен напредък е постигнат в откриването на механизмите на фиброгенезата. Чернодробните stelatни клетки са основните участници в процеса на фиброобразуване. Те изграждат извънклетъчния матрикс (ИКМ) – съединителна тъкан. В процеса на фиброобразуване той е подложен на непрекъснато ремоделиране, водещо до образуване и отлагане на колаген (316).

Ранното диагностициране и лечение на хроничните чернодробни заболявания може да забави прогресирането им, а в някои случаи и да намали степента на фиброза, например при лечение на хроничните вирусни хепатити (221, 43, 207, 166).

Най-честите хронични чернодробни заболявания, водещи до тежко чернодробно увреждане, в детска възраст са билиарна атрезия, хепатит В, хепатит С, аутоимунен хепатит, неалкохолен стеатозен хепатит, болест на Уилсън и алфа-1-антитрипсинов дефицит (55). За ранната детска възраст водещи причинители са билиарна атрезия и наследствените интрахепатални холестазни синдроми (241), докато в детско-юношеска възраст това са вирусните, аутоимунните хепатити (211) и неалкохолната мастна чернодробна болест (НАМЧБ). В последното десетилетие НАМЧБ е една от водещите причини за чернодробна трансплантация при възрастните (315). Същевременно тя се превръща в пандемия в детска възраст (164), като най-малките засегнати пациенти са на 3-годишна възраст (92). Серийни кохортни проучвания (NHANES), основаващи се на повишените стойности на аланин аминотрансфераза (АЛАТ), съобщават за нарастване честотата на НАМЧБ до 2.7 пъти за 30 години (1980-2010 за САЩ) (312). Schimmer et al. в проучване, обхващащо периода 1993-2003 отново в САЩ установяват честота 13% на НАСБ при децата на възраст между 2-19 години, като в групата 15-19 г. достига до 17.3%, в група от 742 деца (247).

2. Чернодробна биопсия

Чернодробната биопсия е златен стандарт за поставяне на етиологичната диагноза, проследяване и оценка на степента на фиброзиране на черния дроб. Тя обаче носи риск от опасни усложнения като кръвоизлив, перфорация на орган, излив на жлъчка, пневмоторакс, образуване на артерио-венозна фистула, инфекция, недостатъчен материал от биопсията и в редки случаи смърт (61). Извършването на биопсия следва да бъде много добре преценено при следните високорискови фактори: употребата на нискомолекулярни хепарини, фокални лезии, остра чернодробна недостатъчност, кърмачета под 3-месечна възраст, голямо количество асцит, тромбоцитопения, предходна неоплазма или трансплантация на костен мозък, хронична бъбречна недостатъчност или дилатация на жлъчните пътища (61). Правилното хистологично разчитане изисква дължина на пробата поне 20 мм (61) и минимум 11 портални пространства (24), както и опитен патоанатом.

Има различни хистологични скали за оценяване на степента на чернодробната фиброза – METAVIR, ISHAK, BRUNT. METAVIR е една от най-използваните скали, първоначално разработена за класифициране на хепатит, причинен от хепатит С вирус. Скалата разглежда степента на фиброза и активност, портално и/или септално възпаление,

некроза, стеатоза, цироза. Заключение, което дава, е степен на фиброза F (F0 - без фиброза; F1 - с портална фиброза без септи; F2 - с портална фиброза с няколко септи; F3 - със септална фиброза без цироза; F4 - цироза) и степен на активност (A0 – без активност; A1 – с минимална активност; A2 – с умерена активност; A3 – с висока активност). METAVIR системата не оценява количествените промени в чернодробния колаген, а се съсредоточава върху оценяването на промени в архитектурата на много малка извадка от чернодробния паренхим (275). Въпреки че разпространението на фиброзната тъкан е хетерогенно, хистологичното стадиране се основава на биопсичен материал, който представлява максимум 1/50 000 от общата чернодробна маса (32). При все че биопсията се използва за количествено стандартизиране на неинвазивните методи за определяне степента на чернодробната фиброза, е възможно различно стадиране от различни патологоанатоми, както различно стадиране от един и същ патологоанатом, гледайки хистологичния препарат през интервал от време (24,287).

За извършването на чернодробна биопсия се изисква добре подготвен екип. Според препоръките на Американската асоциация по детска гастроентерология, хепатология и хранене младши операторът, за да е компетентен, трябва да е извършил самостоятелно 20 чернодробни биопсии, половината от които при деца под 3-годишна възраст (231). В литературата няма информация за взаимовръзката между опитността на оператора и честотата на усложненията (313). При деца всяка една инвазивна манипулация, включително и чернодробна биопсия, се извършва под анестезия, която сама по себе си е високорискова процедура. При кърмачета под 3-месечна възраст има по-голяма вероятност за усложнения при седирането, отколкото при по-големи деца. Проучване, обхващащо 66 деца с чернодробни биопсии, съобщава за по-висока честота на усложненията при седирането (нарушения в дишането) на по-малки деца - 10%, в сравнение с по-големите деца – 2.6% (47,17). Липсват сериозни усложнения. Някои центрове предпочитат прилагането на локална анестезия при по-малките пациенти. В тази група спадат и недоносените (61). Извършването на чернодробна биопсия е високо специализирана дейност и като такава е и скъпо струваща - във Великобритания – 956.61 £ (265), в САЩ – 1,255 \$ (38). Volia et al., разглеждайки 626 чернодробни биопсии при деца, установяват, че извършването им в амбулаторни условия би спестило 80,000 AU \$ годишно. Според тях активно наблюдение на пациентите през първите 8 часа след манипулацията е достатъчно,

за да се диагностицират усложнения. Усложнения са наблюдавани при 30 случая (4.8%), като сериозни (смърт, пневмоторакс, хемобилия, кървене, налагащо интервенция, или инцидент, налагащ болничен престой за ≥ 24 часа) са 13 и 9 от тях са регистрирани през първите 8 часа. Авторите приемат за безопасно извършване на биопсия при стойности на $INR \leq 1.7$ и на тромбоцитите $\geq 60,000/mm^3$. INR не може да предскаже риска от усложнения, свързани с хеморагия (30).

Въз основа на изложеното по-горе, все по-рестриктивни стават критериите за извършване на чернодробна биопсия при деца. Все по-често, имайки предвид изложеното по-горе, възможните рискове от чернодробната биопсия, както и инвазивността на процедурата, много родители отказват децата им да се биопсират. Ето защо се търсят неинвазивни методи за оценка на фиброзата като ултразвукови – еластография и лабораторни тестове – FibroTest-ActiTest, FibroMax, ELF (Enhanced Liver Fibrosis), и други.

3. Ехография

Конвенционалната ехография в B-mode има висока диагностична стойност ($> 90\%$) за откриване на чернодробна цироза при пациенти с усложнения (асцит, спленомегалия, колатерали) (45). Ранните стадии на фиброза и микронодуларна цироза обаче не могат да се диагностицират в до 30% поради възможностите на методиката (66). Ехографските критерии за чернодробна цироза са промени в неговите контури, структура, тъгли, форма (5). Нодуларният образ на повърхността на черния дроб, особено ако се използват високо честотни трансдюсери, има почти 100% положителна предсказваща стойност за цироза (45). Типичните циротични промени – „циротична трансформация на черния дроб“ - са хипертрофия на левия лоб и lobus caudatus, диспропорция между сегментите му. В началните стадии на цироза черният дроб може да бъде общо уголемен, без да е налице диспропорция между сегментите му. За цирозата не е характерна определена промяна в ехогенността на черния дроб. Най-често тя е непроменена или леко повишена. Не трябва да се забравя, че възприемането ехогенността на черния дроб като нормална е в голяма степен субективно и зависи от опита на ехографиста, както и от настройката на апарата (5).

4. Ултразвукова еластография

Исторически първият метод за определяне на плътността на черния дроб е палпацията. За първи път тя се споменава в египетски папируси 1600 години преди

Христа, а след това и от Хипократ (19). Палпацията, при която се определя плътност и контур на черния дроб, е субективна и зависи от опита на изследващия.

Търсейки по-малко субективен метод, се открива еластографията, относително млада обективна методика за определяне на плътност. В медицината ултразвуковата еластографията навлиза през 2003 г. (258).

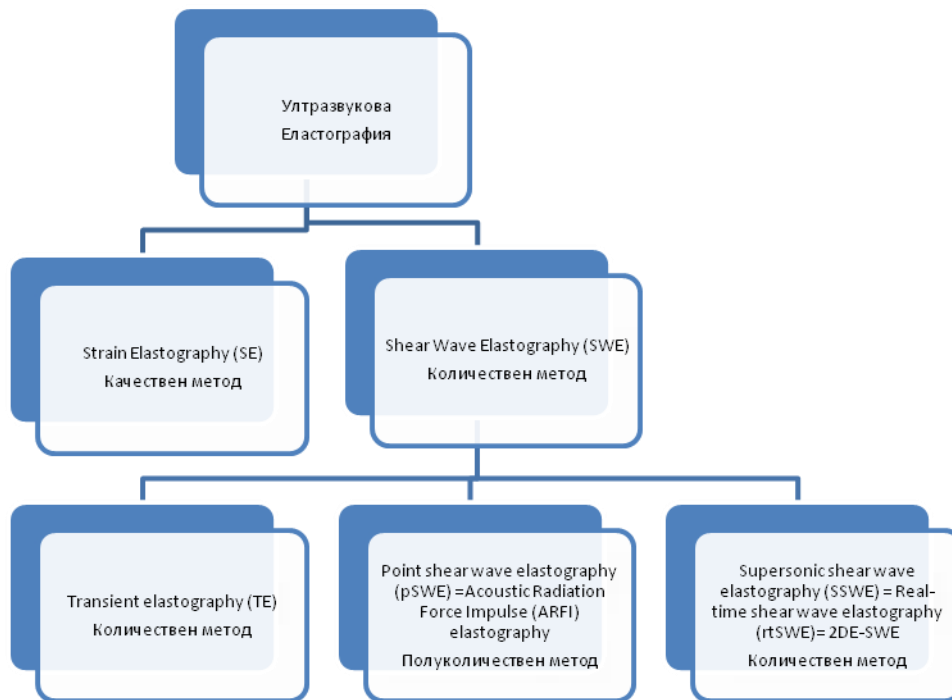
4.1 Strain еластография

За медицинската практика еластографията бива два основни вида: Strain elastography и Shear-wave elastography (SWE). Те оценяват еластичността или твърдостта на изследваните структури. Еластичността се дефинира като мярка за твърдостта на даден материал, която се определя от силата на приложеното напрежение.

Strain еластографията е субективен метод, използващ в същността си степента на деформация на изследваните тъкани, предизвикана от оператора. Операторът прилага натиск върху изследвания орган, като апаратурата изобразява в различен цвят разликата в твърдостта (деформацията) на тъканите. Като мерна единица за еластичност в този случай се прилага отношението между деформацията на различните тъкани, което е относително и не отразява реалната тъканна еластичност/твърдост. При изследването на черен дроб се използва дишането като форма на натиск върху черния дроб. Този вид контролирано дишане и съдействие от страна на пациента е трудно до неприложимо при малки деца.

4.2 Shear-wave еластография

При Shear-wave еластографията апаратът създава свръхзвукова вълна, която предизвиква компресията на тъканите в дълбочина в зависимост от еластичността им. В зависимост от производителите се разделя на Transient elastography (TE) /FibroScan/, Point shear wave elastography (pSWE), наричана още Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) elastography /VTQ Siemens, ElastPQ Phillips/, и Real-time shear wave elastography (rtSWE), наричана още 2D SWE /Supersonic share wave elastography Aixplorer (SSWE), GE, Toshiba/ (Фиг.1) (19). Еластичността се определя в kPa или в m/sec. Чрез формула за модула на Young (E) може да се преизчислява от в kPa в m/sec, като c_s е скоростта на вълните на share wave, ρ е плътността на изследваната тъкан (меките тъкани се приема, че имат относително константна плътност) (40, 141): $E = 3\rho c_s^2$ или $kPa = 3 \times m/sec^2$.



Фигура 4: Видове ултразвукова еластография

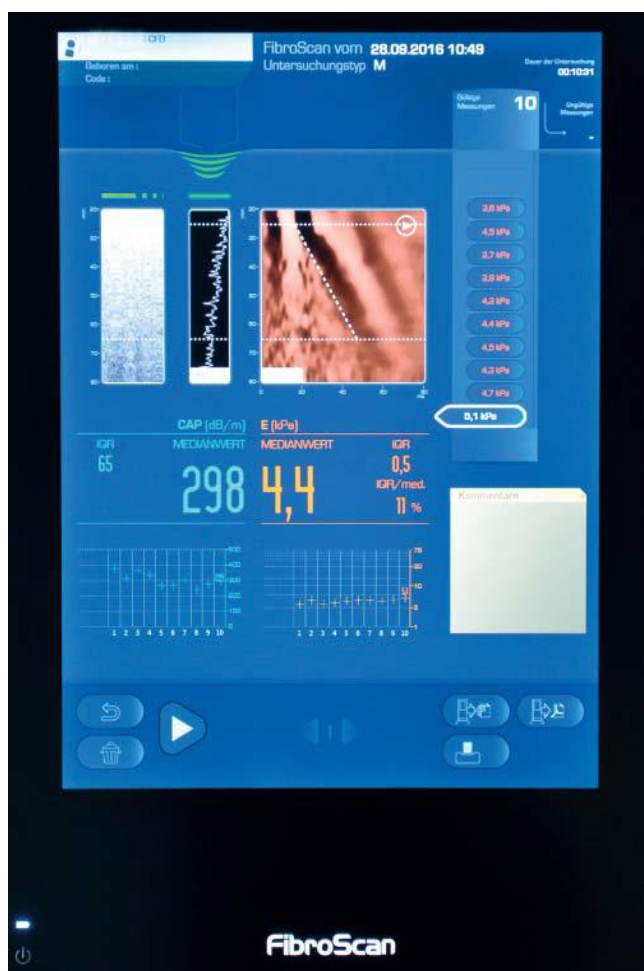
4.2.1. Transient elastography

При Transient elastography (TE) shear-wave вълната се образува чрез оказване на външен натиск с помощта на копче върху трансдюсера. Изследването се прави без B-mode образ. Някои автори съобщават за технически неуспех в 17% при деца по-малки от 2-годишна възраст, а други до 10% независимо от възрастта (85, 76). По препоръки на производителя са необходими 10 правилни измервания чрез интеркостален достъп в десния чернодробен лоб с честота на успех $\geq 60\%$ и вариабилност $\leq 30\%$ (185, 91). Тъй като апаратите с TE са първи на пазара, има натрупан най-голям опит и проучвания с тях както при възрастни, така и при деца. На фигури 2 и 3 са показани начинът на извършване на TE и полученият резултат от измерването. Всеки вид еластография има различни референтни стойности за оценка на чернодробната плътност. Измервания, получени от определен апарат, не могат да бъдат екстраполирани върху друг. С натрупването на опит

при работа с метода еластография се установява, че получените стойности следва да се интерпретират в зависимост от етиологията на чернодробното заболяване. Нужни са още големи проучвания в различни възрастови групи с различни хронични чернодробни заболявания, за да се стандартизират норми.



Фигура 2: Измерване на чернодробна плътност чрез FibroScan (TE)



Фигура 3: Изобразяване на нормална чернодробна плътност чрез FibroScan (TE) (56)

4.2.2 Supersonic shear-wave еластографията (SSWE)

Supersonic shear-wave еластографията (SSWE) представлява специализирано ехографско изследване, което количествено определя еластичността на тъканите в kPa или в m/sec. Точността на измерването е висока. Позволява долавяне на фини промени в структурата на чернодробния паренхим при деца, както и на чернодробно трансплантирани пациенти. Дава възможност за детайлно проследяване във времето развитието дори на най-малки промени и ефекта от лечение. Плътноста се визуализира в цветна и количествена скала (в kPa или m/sec) върху B-mode образ (фиг. 3). При изследването на черен дроб не се използва дишането на пациента като форма на натиск върху черния дроб. Не е необходимо контролирано дишане и съдействие от страна на пациента. Методът е отлично приложим при деца.



Фигура 3: Ултразвуков апарат за Supersonic shear-wave еластография

Jung et al. в скорошно проучване с 57 деца на възраст 12.7 ± 4.3 години с различни чернодробни заболявания потвърждават, че няма значима разлика в чернодробната

плътност при нормално дишане и задържане на дишането ($7.22 \pm 4.5 \text{kPa}$ vs. $7.21 \pm 4.11 \text{kPa}$). Извършването на SSWE в условия на нормално дишане значително намалява времето за извършване на изследването (129). Пилотно проучване с SSWE при 96 деца (51 здрави и 45 с чернодробно заболяване, при последните е направена и биопсия) на възраст между 0 и 18 години доказва, че полът, мястото на измерване (в междуребрието или в епигастриума) и дишането не влияят на чернодробната плътност (90). Sporea et al. (274), както и други автори (149), препоръчват използването на средна аритметична стойност от 3 измервания чрез интеркостален достъп на десен лоб на 1,5-2 см под Глисоновата капсула, като се избягват големи кръвоносни съдове, в легнало по гръб положение с вдигната дясна ръка, на гладно. А препоръките на Световната федерация по ултразвук в медицината и биология (WFUMB) за SSWE са 4 измервания (81). За разлика от останалите еластографски методики, които се влияят съществено от храненето, A. Popescu et al. в проучване с 50 чернодробно здрави доброволци доказват, че приемът на храна не увеличава значимо плътността на черния дроб на 30-та, 60-та и 120-та минута след хранене за SSWE (217). Това има голямо значение, защото малките деца и кърмачета не съдействат при изследването, ако са гладни.

5. Еластография при хронични вирусни хепатити

Еластографията се внедрява за първи път при проследяване еволюцията на чернодробната фиброза при хронични вирусни хепатити – хепатит В (HBV) и хепатит С (HCV), и нейната динамика при започване и в хода на лечение (234, 23, 82). До момента са публикувани 6 проучвания при HCV (39, 331, 14, 59, 160, 325), 5 за HBV (14, 42, 46, 167, 99) и HCV-HIV (56). Според авторите стойностите на чернодробна плътност съответстват на степените на фиброза по хистологичната скала METAVIR. Най-добра диагностична стойност има при напреднала фиброза и цироза. Транзиторната еластография точно различава цироза от напреднала фиброза (AUC 0.87–0.98) (AUC 0.75–0.93) (81). Ferraioli et al. в пилотно проучване, обхващащо 121 пациенти с хроничен хепатит С, при които е извършена ТЕ, SSWE и чернодробна биопсия, установяват, че SSWE е по-точен метод спрямо ТЕ за оценяване на значима фиброза ($\geq F2$). Освен това SSWE превъзхожда ТЕ с възможността да се изобразява фиброзата в реално време върху В-mode. Така изборът на

място за оценка на фиброза се контролира както от скалата за плътност, така и от подлежащия анатомичен образ (82).

В детска възраст има само едно проучване с ТЕ за оценка степента на фиброза при хроничен хепатит С, което обхваща 30 деца (15). В него стойностите от ТЕ са сравнени с резултатите от биопсия, оценени по METAVIR и неинвазивни кръвни тестове за оценка на чернодробната фиброза, FibroTest-ActiTest, APRI, Forn Index и хиалууронова киселина. Резултатите потвърждават тенденциите, наблюдавани и при възрастни, а именно - най-добра корелация между измерена чернодробна плътност и хистологичния отговор има при напреднала фиброза (F3) и цироза (F4).

Малък е броят на проучванията при деца за оценка на фиброзата чрез ултразвукова еластография. Това се дължи на факта, че хроничните чернодробни заболявания са редки в детска възраст. Освен това и малкото проучвания са с хетерогенни групи поради тази причина. При две такива с ТЕ има и групи деца с хроничен хепатит В и С, изводите са аналогични - по-висока диагностична стойност има изследването при значителна фиброза и цироза (55, 86). Подобни са резултатите при деца с Point shear-wave elastography (pSWE) (168, 112, 197, 147).

За първи път в България при възрастни с хронични вирусни хепатити Комитова и Дойков използват транзиентна еластография 2DE-SWE и съответно rteSWE, за да оценят чернодробното увреждане (4, 3, 69, 1).

Комитова и сътрудници провеждат ТЕ и чернодробна биопсия при 102 пациенти с хронични чернодробни заболявания, включително и вирусни хепатити, и намират най-висока диагностична стойност за установяване на цироза ($\geq F4$) (AUC 0.925, $p < 0.0001$) при cut-off $\geq 11,4$ kPa. Диагностичната стойност на ТЕ намалява значително при определяне на напреднала фиброза ($\geq F3$) (AUC 0.514, $p < 0.0001$) и значима фиброза ($\geq F2$) (AUC 0.230, $p < 0.0001$) (3). През 2019 г. Комитова и съавтори използват едновременно ТЕ и 2D-SWE (GE, Logiq S8, E9) за определяне степента на фиброза при 72 пациенти с HCV, при които е извършена чернодробна биопсия. Авторите съобщават за 89% чувствителност и 95% специфичност при cut-off ≥ 10.0 kPa за 2D-SWE и 88% чувствителност и 97% специфичност при cut-off ≥ 10.6 kPa за ТЕ при пациенти с F4 (4).

Дойков и сътрудници сравняват степента на чернодробна фиброза, определена с биопсия с *teSWE*, при 80 възрастни пациенти с HBV и 34 с HCV. Те откриват диагностична точност на *teSWE* само за определяне на напреднала фиброза ($\geq F3$) (AUC 0.962, $p < 0.001$), но не и за по-ниските степени на фиброза (69).

6. Еластография при неалкохолна мастна чернодробна болест

Работи се активно и в разработването на еластографски норми за оценка на чернодробната стеатоза и фиброза при възрастни и деца с неалкохолна мастна чернодробна болест (НАМЧБ). Както при възрастните, така и при децата честота на наднорменото тегло и затлъстяване непрекъснато се увеличава. Проучвания от САЩ съобщават за честота на НАМЧБ от 0.7% при деца на възраст между 2-4 години (потвърдено при аутопсия) до 29-38% при деца със затлъстяване (159, 246, 283, 312, 223). Детската НАМЧБ се определя като хронична чернодробна стеатоза при лица под 18-годишна възраст, която е първична, а не като резултат на инфекции, употребата на стеатогенни медикаменти, консумация на алкохол, малнутриция или други генетични/метаболитни заболявания. При повечето деца с НАМЧБ състоянието се свързва с инсулинова резистентност, централно или генерализирано отлагане на мастната тъкан и дислипидемия с високи триглицериди и ниски стойности на HDL-холестерола. Въз основа на хистологичната находка НАМЧБ бива два вида: неалкохолна стеатоза (НАС) и неалкохолен стеатозен хепатит (НАСХ). Неалкохолната стеатоза се характеризира с лекостепенно натрупване на мазнини, а НАСХ - със стеатоза, лобуларно възпаление и чернодробна увреда. Възможна е и фиброза, знак за по-тежко засягане, дори при отсъствие на НАСХ.

Макар и рутинно да се използва конвенционалната ехография в B-mode като скрининг за установяване на стеатоза, тя има ниска чувствителност и специфичност при деца с ниска степен на стеатоза (обхващаща $< 33\%$ от хепатоцитите) (309, 159). Магнитно-резонансното изследване и спектроскопия са точни изобразяващи методи за количествено определяне на чернодробната стеатоза както при възрастни, така и при деца (187, 247). За момента обаче са твърде скъпи, за да се използват като скрининг, не са широко достъпни и липсват валидирани норми за НАМЧБ. Диагностичната стойност на компютърната томография за откриване на стеатоза при деца и възрастни дава чувствителност 46-72% и специфичност 88-95%. Не се препоръчва за скрининг за НАМЧБ поради облъчване (309).

В тази връзка може да се изтъкне предимството на еластографията, ултразвукова и магнитно-резонансна, като неинвазивен метод за определяне на степента на чернодробна стеатоза и фиброза. Магнитно-резонансната еластография (МРЕ) регистрира клинично значима фиброза с ROC крива от 0.92 и зависи от апаратурата и оператора (316). Тя комбинира традиционния ядрено-магнитен резонанс с нискочестотни звукови вълни. В зависимост от секвенцията, която се използва, МРЕ може да се постигне между еднократно и четирикратно задържане на дишането. Serai et al. съобщават за успешно извършване на МРЕ на 4-месечно кърмаче без анестезия, но при още по-малки деца и такива с изоставене в нервно-психическото развитие е необходимо седирание (253). Schwimmer et al. в проучване при 90 деца с НАМЧБ на възраст 13.1 ± 2.4 години сравняват чернодробната плътност, установена чрез 2Д-МРЕ, с хистологичната оценка от чернодробната биопсия. Авторите споделят опит, че утвърдените норми на МРЕ при възрастни с НАМЧБ не могат и не трябва да се екстраполират при деца. 2Д-МРЕ може да определя чернодробната плътност при деца с НАМЧБ. Необходими са още проспективни проучвания в детска възраст за изработване на норми на чернодробна плътност с МРЕ (245).

Особена група пациенти с по-висок риск за развитие на НАМЧБ са тези с хронични възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ), които включват болест на Крон, улцерозен колит и неклассифициран колит. Bessissow и сътрудници съобщават за 36% честота на НАМЧБ сред 321 възрастни пациенти с ХВЧЗ (37). Механизмът, по който са свързани двете заболявания, не е ясен. Предполага се, че в основата стои подлежащото хронично възпаление (33, 176). Пациентите с ХВЧЗ се нуждаят от по-малък брой метаболитни фактори в сравнение с общатата популация, за да развият НАМЧБ (27, 33, 224). Пациентите с ХВЧЗ и НАМЧБ имат значително по-малък ИТМ, по-малка коремна обиколка и по-високи стойности на трансаминазите в сравнение с пациенти само с НАМЧБ (243). Palumbo et al. използват транзиторна еластография и нейна функция, наречена controlled attenuation parameter (CAP), за да диагностицират НАМЧБ при 384 пациенти с ХВЧЗ. Те откриват 32.8% честота на чернодробна стеатоза и 12.2% наличие на значима фиброза $\geq F2$ (cut-off стойност ≥ 7.00 kPa) (243). За момента липсват данни за честотата на НАМЧБ при педиатрични пациенти с ХВЧЗ.

Какъв е опитът с ултразвуковата еластография при деца с НАМЧБ? Транзиторната еластография има ROC крива 0.79-1.0 за разпознаване на клинично значима фиброза (85, 9, 196). Bailey et al. използват pSWE (ElastPQ) за да сравнят чернодробната плътност на 124 деца със затлъстяване и 176 с нормално тегло, като референтен метод е избрана ехография в B-mode. Тя доказва, че децата със затлъстяване и патологичен ехографски образ на B-mode имат увеличена чернодробна плътност спрямо тези с нормално тегло ($1.53 \text{ m-sec} \pm 0.38$ vs. 1.17 ± 0.27) (18). Публикация на Gargovich и екип, обхващаща 68 деца с хистологично определен неалкохолен стеатохепатит по скалата на Brunt, определя cut-off стойности за степента на фиброза за SSWE (99). Те установят липса на фиброза при стойности от еластографията $\leq 5.1 \text{ kPa}$ и наличие на значима фиброза F2 при $\geq 6.7 \text{ kPa}$ (чувствителност 87%; специфичност, 96%). Екипът не е успял да получи еластографски образ при 1 пациент с индекс на телесна маса (ИТМ) 40 kg/m^2 и изключително дебела интеркостална стена на гръдния кош. Този резултат (неуспех) корелира с публикуваните ограничения за получаване на качествен образ при дебелина на гръдния кош интеркостално $\geq 25 \text{ mm}$, ИТМ $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, хистологично доказана стеатоза и коремна обиколка $\geq 102 \text{ cm}$ (64). В сравнение с други проучвания за определяне степента на фиброза в детска възраст чрез SSWE намерените cut-off стойности за сигнификантна фиброза F2 при $\geq 6.7 \text{ kPa}$ са значително по-ниски. Например Dhyani et al. (62), Tutar et al. (296) и Franchi-Abella et al. (90) съобщават за cut-off стойности на F2 съответно 8.7 kPa, 10.4 kPa и 12.1 kPa. Това вероятно се дължи на хетерогенните групи чернодробни заболявания, както и на широкия възрастов диапазон - от новородени до юноши. Докато изследваните от Gargovich et al. (99) деца съставляват хомогенна група, само с НАСХ. Проучвания при възрастни със НАМЧБ/НАСХ чрез SSWE демонстрират сходни оптимални cut-off стойности на значима фиброза, вариращи от 6.7 до 7.3 kPa (322, 235).

7. Еластография при муковисцидоза

Нараства значението на еластографията при оценяване на чернодробното засягане при кистична фиброза. Чернодробно заболяване при муковисцидоза се наблюдава при 30 до 40% от децата над 12-годишна възраст, като 10% развиват цироза преди навършване на 18 години (145, 48, 52). Този процес протича скрито и без оплаквания в детска възраст (155). Определяне на ангажирането и степента на увреждане на черния дроб при муковисцидоза е предизвикателство поради липса на специфични и чувствителни методи и

маркери (58). Международните препоръки за муковисцидоза са проследяване на чернодробните ензими поне веднъж годишно. Абдоминална ехография и чернодробна биопсия се препоръчват при трайно повишени трансаминази при липса на обективна причина (266). Освен това хистологичният резултат, получен чрез извършване на биопсия, е инсуфициентен показател за степента на фиброза, тъй като за муковисцидозата е характерна фокална билиарна цироза. В малки педиатрични проучвания (студии) се съобщава за несъответствие в хистологичния отговор в 38% от случаите при извършване на dual pass биопсии (през един перкутанен достъп се взимат два различни материала под различен ъгъл) (150). До момента хомогенни проучвания с еластография за оценка на чернодробното заболяване при деца, болни от муковисцидоза, са три с TE 1 (222, 12, 105) и две с pSWE 2 (182, 26). Най-голямото е на Aquil и сътрудници, обхващащо 249 болни на възраст между 1 месец и 25 години, като 74 от тях са ≥ 18 години. Те установят, че TE е надежден неинвазивен метод за оценка прогресията на чернодробна фиброза. Освен това TE е по-добър маркер за оценка степента на фиброза спрямо APRI при пациенти с портална хипертония, като cut-off стойности за тази група болни са съответно 6.2 kPa за TE и 0.35 за APRI. Едновременното им приложение не увеличава дискриминативната им стойност. Недостатък на проучването е, че чернодробна биопсия е извършвана само при 5 от пациентите. Друго, което трябва да се отбележи, е, че най-много неправилни измервания са наблюдавани при деца под 3 години заради липса на съдействие (12). Gominon et al. проследяват ретроспективно чрез TE 82 деца с кистична фиброза и намират, че чернодробната плътност нараства с времето, като степента на нарастване е по-стръмна при пациентите с чернодробно засягане - 7 от тях (105). Това съвпада и с данните, получени от Behrens с pSWE при 36 деца с муковисцидоза (26).

8. Еластография при болест на Уилсън

Предварителните данни от проучване при 9 деца с болест на Уилсън чрез TE установяват, че чернодробната плътност намалява от 15.1 kPa съответно на 6.1 kPa след започване на хелаторното лечение (277). Авторите намират, че стойностите на TE са значимо високи при диагностициране и в хода на лечение постепенно намаляват (277). При възрастни с болест на Уилсън има две проучвания, едно с TE (261) и едно с TE и pSWE за неинвазивна оценка на чернодробното увреждане (132). Резултатите показват, че

стойностите на чернодробната плътност нарастват пропорционално със степента на фиброза и цироза. Транзиторната еластография има по-голяма диагностична стойност при оценяването степента на фиброза при пациенти с болест на Уилсън спрямо pSWE (132).

9. Еластография при билиарна атрезия

Билиарната атрезия (БА) е най-честата за Европа индикация (74%) в ранна детска възраст за извършване на чернодробна трансплантация с честота 1:14 000 живородени (78). Стремещт е към възможно най-ранното поставяне на диагнозата. Ако диагнозата се докаже в рамките на 2-ия месец след раждането, кърмачето има до 80% шанс за успешна порто-ентероанастомоза по Касай.

Ехографската диагнозата на билиарната атрезия не е точна, тя се основа на липсата на жлъчен мехур или наличието на атретичен такъв, който не се контрахира преди и след хранене, дължината на жлъчния мехур, наличието на ехографския триъгълен знак, увеличен диаметър на a.hepatica, наличие на субкапсуларен кръвоток. Тези признаци са вариабилни, субективни и зависят от опита на ехографиста (321). По този проблем работи колектива на Zhou от Китай. Те сравняват 172 кърмачета с холестатични заболявания (общ билирубин $\geq 31.2 \mu\text{mol/L}$, като директната е по-голяма от индиректната фракция) на възраст от 2 - 140 дни, от които 97 - с билиарна атрезия, 75 - с други заболявания, и контролна група от 40 здрави кърмачета. Включени са деца, при които има жлъчен мехур, който изглежда нормален, и при които липсва ехографският знак на триъгълната корда. При тях се извършва конвенционална ехография в B-mode и SWE с конвексен 1- to 6-MHz трансдюсер и 4-15-MHz линеарен трансдюсер (SL15-4). Направени са по 3 измервания по време на хранене чрез субкостален достъп перпендикулярно на кожата, без да се прилага натиск. Авторите установяват, че чернодробната плътност на кърмачета на възраст над 60 дни ($n = 10$) е значимо по-висока - $6.1 \text{ kPa} \pm 1.1$ спрямо тази $5.3 \text{ kPa} \pm 1.0$ на възраст под 60 дни ($n = 30$). За cut-off стойност за наличие на билиарна атрезия намират $\geq 10.2 \text{ kPa}$ с чувствителност, специфичност, положителна предиктивна стойност и негативна стойност съответно 81.4%, 66.7%, 76.0% и 73.5%. Клиничната значимост на чернодробна плътност за БА като единствен маркер е самостоятелно по-ниска спрямо тази на ехографския триъгълен знак и абнормности в жлъчния мехур. Диагностичната стойност нараства, ако плътността се комбинира с ехографския триъгълен знак и абнормности в жлъчния мехур ($P = 0.001$). Освен това те откриват, че чернодробната плътност при БА не

корелира със стойностите на аминотрансферазите, а се влияе от възрастта и от нивата на общия и директен билирубин (329). Lischied и съавтори също доказват, че с pSWE (VTQ) достоверно може да различи БА от други холестатични заболявания в неонатална възраст (147). Shen et al., използвайки TE (Fibroscan), намират стойности на чернодробната плътност $15.15 \text{ kPa} \geq F4$ за цироза, сравнявайки я с биопсия при 31 деца с БА (256). В две проучвания чрез еластография проследяват прогресирането на фиброза при деца след портоентероанастомоза по повод БА – едно с SSWE при 24 деца и едно с TE при 69 деца (44, 320).

10. Еластография за проследяване усложненията на цироза

От изключителна важност е своевременното насочване на децата за извършване на чернодробна трансплантация, преди да са възникнали усложненията на цирозата. Yoon и съавтори намират cut-off стойности на чернодробната плътност $\geq 18.4 \text{ kPa}$ за интрахепатална портална хипертония при 32 деца с различни хронични чернодробни заболявания, чувствителност 87.5%, специфичност 84% (320).

Клинично значима портална хипертония се определя като чернодробен градиент на венозно налягане (HPVG) $\geq 10 \text{ mm Hg}$, то е предиктор за кървене от варици, портална хипертензивна гастропатия и асцит (31, 98, 58, 308). Въпреки практическата му важност употребата му в детска възраст е ограничена поради инвазивността му, облъчване с йонизираща радиация, необходимостта от седация или пълна анестезия, както и цената му (320). Yoon et al. извършват 5-кратни измервания на чернодробната плътност със SSWE и ги сравняват с измерения HPVG в рамките на 2 седмици. За подгрупата деца след чернодробна трансплантация – 11 деца с cut-off стойности от еластографията, съответстващи на портална хипертония, са значително по-ниски $\geq 13.1 \text{ kPa}$, диагностична точност 81.8%, чувствителност 100%, специфичност 75.5% (320).

11. Еластография при чернодробна трансплантация

Еластографията е перспективна и в проследяването на усложнения при деца с чернодробна трансплантация. Различните трансплантационни центрове имат собствени протоколи за периодите на извършване на чернодробна биопсия. Независимо дали има съмнения (клинично и лабораторно) за проблем или не, голяма част от центровете извършват рутинна биопсия на 5-та и 10-та година след трансплантацията (61). Проучване

от година, обхващащо 117 чернодробно трансплантирани деца, като 36 от тях са биопсирани, доказва корелация с ТЕ еластография FibroTest и ELF. Корелацията между ТЕ и хистологично верифицираната фиброза е значимо по-висока, отколкото с неинвазивните кръвни тестове. Чернодробната плътност при трансплантирани деца е значимо по-голяма спрямо тази при здрави деца в отсъствие на хистологична фиброза (7.55 [5.4–20.4] kPa vs. 4.5 [2.5–8.9] kPa) (104). Jeong Hee Yoon et al. го потвърждават при 216 трансплантирани възрастни чрез SSWE (319). Tomita et al. определят чернодробната плътност при 65 трансплатирани деца чрез pSWE и я сравняват с резултата от биопсията при 51 от тях. Авторите намират, че стойности между 1.30 (5.07 kPa) и 1.39 m/sec (5.79 kPa) от еластографията отговарят хистологично на фиброза \geq F2 (289).

12. Кръвни маркери за определяне на фиброза

Освен еластографията все повече учени се опитват да открият и да стандартизират неинвазивни кръвни маркери, които да имат висока и дори съпоставима специфичност и чувствителност с чернодробната биопсия. Основният механизъм при образуването на чернодробната фиброза е нарушението в баланса между синтезирането и отстраняването на извънклетъчния матрикс. Чернодробните stelatни клетки в най-голяма степен образуват ИКМ. При чернодробно увреждане те се стимулират от различни цитокини (21, 22, 127, 93). Активацията и пролиферацията на чернодробните stelatни клетки води до отлагането на големи количества ИКМ (250, 129, 93, 94). В случаите на напреднала фиброза ИКМ може да е шест пъти повече, отколкото в здрав черен дроб (22, 94). Неинвазивните биомаркери могат да се класифицират в следните 2 основни групи:

Клас 1 маркери на фиброза/директни биомаркери и Клас 2 маркери на фиброза/индиректни биомаркери (21, 250, 251, 127, 213). Директните маркери съответстват или са част от чернодробния матрикс, който се образува от чернодробните stelatни клетки по време на трансформацията на ИКМ във фиброза (21, 127, 251, 212). За разлика от тях индиректните маркери отразяват промяната в чернодробната функция. Те са молекули, които се освобождават в кръвта при възпалителен процес в черния дроб, но не корелират с преобразуването на ИКМ във фиброза (21, 212).

Клас 1 маркери на фиброза са:

1. Директни маркери, свързани с депозирането на матрикс - проколаген тип I и тип III, тип IV колаген, хиалууронова киселина, ламинин
2. Директни маркери, свързани с разграждането на матрикс – металопротеинази – 1, металопротеинази – 2, металопротеинази – 9, инхибитори на матриксните металопротеинази
3. Цитокини и хемокини, свързани с чернодробна фиброза – β трансформиращ растежен фактор, α трансформиращ растежен фактор

Клас 2 маркери на фиброза са:

1. Аланин аминотрансфераза (АЛАТ)
2. Отношение то Аспарат аминотрансфераза (АСАТ)/АЛАТ
3. Отношението АСАТ/тромбоцити = APRI
4. FibroTest-ActiTest
5. FibroMax и много други

Комбинираните тестове с клас 1 и 2 маркери:

1. ELF (Enhanced Liver Fibrosis) и др.

12.1 АЛАТ

Серумното ниво на АЛАТ е един от първите маркери за оценка на чернодробното засягане (249). Pradat и екип доказват, че измерването на АЛАТ е клинично полезно, тъй като има висока чувствителност и специфичност (АЛАТ ≥ 2.5 N предсказва патологична чернодробна хистология) (219). Но стойностите на АЛАТ се влияят от много фактори – пол, ИТМ, употреба на хепатотоксични медикаменти (220, 6). Последните клинични препоръки за диагностициране и лечение на неалкохолната стеатозна болест в детска възраст на Северноамериканското дружество по детска гастроентерология, хепатология и хранене (NASPGHAN) от 2017 г. приемат за нормални стойности в детска възраст на АЛАТ 22 IU за момичета и 26 IU за момчета, независимо от референтните стойности на изследващата лаборатория. За момента най-добрият скрининг за НАСБ се състои в динамичното проследяване на повишени стойности на АЛАТ > 22 IU за момичета и > 26 IU за момчета. Трайно повишен АЛАТ $> 2X$ за повече от 3 месеца е алармиращ за НАСБ или друго хронично чернодробно заболяване. Стойности на АЛАТ > 80 IU говорят за сериозно чернодробно заболяване. Деца с НАСБ могат да имат фиброза без НАСХ (309).

Нормалните нива на чернодробни ензими не изключват значимо чернодробно увреждане, вкл. цироза (89). Проучване от 2014 г. с 91 деца с НАСБ, доказана хистологично, открива, че 19% от децата са имали нормални стойности на АЛАТ (180).

12.2 АСАТ/АЛАТ

Отношението Аспартат аминотрансфераза (АСАТ)/АЛАТ също е сравнително стар маркер за оценка на чернодробна фиброза. Валидиран е при различни чернодробни заболявания (291, 296) и отношение >1 е предиктивно за цироза (101, 252).

12.3 APRI

Отношението АСАТ/тромбоцити = APRI е разработено през 2003 г. от Wai и екип по формулата (310):

$$\text{APRI} = \frac{\text{АСАТ}}{\text{Тромбоцити} \times 10^9} \times \text{Норма}$$

Тяхното проучване установява стойност 0.89 за напреднала фиброза/цироза. Много други проучвания, проведени при възрастни, също потвърждават високата му точност да предскаже напреднала фиброза при различни хронични чернодробни заболявания (251, 259, 158, 264). Snyder et al. намират cut-off ≤ 0.42 за диагностициране на лека фиброза, отрицателна предсказваща стойност 95% (264). Но се оказва, че няма диагностична стойност за оценката на фиброза при автоимунен хепатит (158) за разлика при възрастни след чернодробна трансплантация (291).

Какво показват проучвания с APRI при деца? Опитът е значително по-малък, а резултатите са крайно разнородни. Прегледът на публикациите в литературата показва, че дизайнът на проучвания е много различен, с различни cut-off стойности и хетерогенни клинични групи. От една страна, това може би се дължи на различни норми на АСАТ в различните възрастови групи, както и на разнородната група чернодробни заболявания в детска възраст. В голяма част от публикациите авторите не информират каква стойност на АСАТ приемат за норма, в другата част приемат АСАТ 40 IU за норма (173, 63). В 3 проучвания при деца с вирусни хепатити APRI е сравнен с биопсия като cut-off за фиброза и цироза ≥ 0.5 и ≥ 1.5 (173), ≥ 0.656 за фиброза $\geq F2$ (216), ≥ 0.83 за фиброза $\geq F2$ (328). В проучване с 68 деца с различни хронични чернодробни заболявания авторите сравняват

APRI и FibroTest-ActiTest с чернодробна биопсия. Те установяват, че FibroTest-ActiTest и APRI различават успешно липсата на фиброза от наличието на такава F3, cut-off за APRI 0.82. При 62 деца с тънкочревна недостатъчност на парентерално хранене Díaz и колектив откриват, че APRI успешно може да предскаже чернодробна цироза при cut-off ≥ 2 , но не и фиброза (63). APRI е използван и при деца с БА за оценка на цироза, cut-off ≥ 1.22 (108). Yang и съавтори ретроспективно намират при 91 кърмачета с БА cut-off стойност за цироза ≥ 1.66 , като при проследяването им след изпършване на портоентероанастомоза, cut-off стойности на APRI ≥ 0.60 , предсказват незадоволителен ефект от операцията (318). Колектив от Турция изследва APRI при 100 деца с холестатични чернодробни заболявания, като ги разделят в 2 групи – хепатоцелуларна и билиарна. Cut-off стойностите F3/F4 за хепатоцелуларната група са ≥ 0.93 , а за билиарната ≥ 2.35 (297). D'Souza et al. от King's College изследват APRI при 39 деца с трансплатиран черен дроб. Те установяват, че той е полезен неинвазивен маркер за проследяване еволюцията на развитие на фиброза при дългосрочно проследяване на трансплантирани пациенти. Екипът открива cut-off ≥ 0.45 за APRI за значима фиброза (ISHAK score ≥ 3) при биопсирани пациенти средно на 10-та година след трансплантацията (70).

12.4 FIB-4

През 2006 г. Sterling и сътрудници разработват нов индекс за оценка на чернодробна фиброза при 832 възрастни, коинфектирани с HIV и HCV, наречен Fibrosis 4 score (FIB-4). Индексът се изчислява въз основа на годините, стойностите на АСАТ, АЛАТ и тромбоцитите по следната формула:

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{Годините} \times \text{АСАТ (IU/l)}}{\text{Тромбоцити (10}^9\text{)} \times \sqrt{\text{АЛАТ (IU/l)}}}$$

Изследователите използват маркера за определяне на напреднала фиброза ($\geq F3$). Те намират, че стойност под 1.45 изключва F3, а над или равна на 3.25 има положителна предиктивна стойност 65% и специфичност 97%. Площта под кривата за определяне на F3 е 0.765 (278). По-късно FIB-4 започва да се прилага при пациенти с хепатит С.

Какво е приложението му и какви са стойностите му при деца? Pokorska-Spiewak и екип изследват FIB-4 и APRI при 30 деца с хроничен С хепатит, при които е проведена и чернодробна биопсия. Те намират cut-off стойности за сигнификантна фиброза ($\geq F2$) за

FIB-4 - 0.180 и за APRI - 0.656 съответно. Кореспондиращите криви за FIB-4 и APRI са AUROC 0.708 (95% CI 0.514–0.859) и 0.752 (95% CI 0.561–0.890). Авторите разработват собствени модифицирани индекси M-FIB-4 и M-APRI, в които включват BMI z-scores по следните формули:

$$M-FIB-4 = BMI \text{ z-score} \times FIB-4$$

$$M-APRI = BMI \text{ z-score} \times APRI$$

Екипът сравнява оригиналните маркери и модифицираните и установява, че M-FIB-4 и M-APRI корелират по-силно с хистологията в сравнение с FIB-4 ($r=0.36$ (–0.01–0.64), $p = 0.05$ vs. $r=0.18$ (–0.20–0.51), $p = 0.35$) и APRI ($r =0.44$ (0.08–0.69), $p = 0.01$ vs. $r=0.34$ (–0.03–0.63), $p = 0.06$) съответно (216).

През 2019 г. Varakat и съавтори изследват FIB-4, APRI и АСАТ/АЛАТ при 166 деца с хроничен С хепатит, при които е проведена и чернодробна биопсия. Те разделят децата спрямо хистологичната находка на такива без фиброза (F0), с лека (F1, F2) и напреднала фиброза (F3, F4, F5), използвайки ISHAK класификацията. За наличие на каквато и да е фиброза ($\geq F1$) cut-off стойностите са за FIB-4 > 0.21 (AUC \pm SE 0.74 \pm 0.60; Sensitivity 0.58; Specificity 0.82), APRI >0.33 (AUC \pm SE 0.78 \pm 0.05; Sensitivity 0.80; Specificity 0.60) и АСАТ/АЛАТ >1.42 (AUC \pm SE 0.52 \pm 0.06; Sensitivity 0.13; Specificity 1.00). За лека фиброза cut-off стойностите са за FIB-4 >0.13 (AUC \pm SE 0.66 \pm 0.07; Sensitivity 0.83; Specificity 0.45), APRI >0.315 (AUC \pm SE 0.74 \pm 0.09; Sensitivity 0.77; Specificity 0.66) и АСАТ/АЛАТ ≤ 0.855 (AUC \pm SE 0.53 \pm 0.07; Sensitivity 0.86; Specificity 0.26). За напреднала фиброза cut-off стойностите са за FIB-4 >0.27 (AUC \pm SE 0.828 \pm 0.068; Sensitivity 0.73; Specificity 0.85), APRI >0.68 (AUC \pm SE 0.816 \pm 0.070; Sensitivity 0.67; Specificity 0.91) и АСАТ/АЛАТ >1.42 (AUC \pm SE 0.590 \pm 0.090; Sensitivity 0.27; Specificity 0.98) (21).

Fibrosis 4 score е прилаган и при деца с НАМЧБ. Schwimmer и сътрудници изследват FIB-4 при 193 деца с хистологично верифицирана НАМЧБ. Тридесет и осем деца от тях имат напреднала фиброза. При тях средната стойност на FIB-4 е 0.34 (248). Alkhourі и екип изследват 242 с НАМЧБ, от които 36 (15%) са развили напреднала фиброза ($\geq F3$). Стойностите на FIB-4 и APRI са значимо по-високи при тях в сравнение с децата с по-лека фиброза (0.32 \pm 0.14 vs. 0.26 \pm 0.15 , $p = 0.037$) и (0.51 [0.39, 0.80] vs. 0.40 [0.30, 0.55] $p = 0.001$) (8). Mansoor и колеги прилагат FIB-4, APRI, АСАТ/АЛАТ при 92 деца с

хистологично доказана НАМЧБ. Те намират, че FIB-4 и АСАТ/АЛАТ не могат да открият наличието на каквато и да е фиброза - нито сигнификантна, нито напреднала. APRI има добра диагностична стойност да открива фиброза AUROC 0.800 (95 % CI 0.695–0.904) и никаква за сигнификантна или напреднала фиброза (165). Аналогични резултати съобщават Jackson и сътрудници от САЩ за 146 деца с НАМЧБ, при които е взета биопсия. Отношението АСАТ/АЛАТ, както и FIB-4 не могат да различат сигнификантна от несигнификантна фиброза. APRI различава двете групи фиброза ($p=0.004$), но има незадоволителна AUROC 0.670 (95 % CI 0.556–0.775) (126). Авторски колектив от Азия съобщава за значимо по-високи стойности на FIB-4 (0.24 ± 0.12 vs 0.31 ± 0.21 , $p = 0.010$) и APRI (0.67 ± 0.54 vs 0.78 ± 0.38 , $p = 0.032$) при деца със сигнификантна фиброза в сравнение с лека фиброза вследствие на НАМЧБ. Площта под кривата е съответно 0.81 за FIB-4 и 0.70 за APRI. Отношението АСАТ/АЛАТ не различава отново двете групи фиброза (317).

FIB-4 заедно с APRI е използван и при 62 деца с муковисцидоза, стадирана хистологично.

12.4 FibroTest-ActiTest

FibroTest-ActiTest комбинира шест серумни биомаркера с възрастта и пола на пациента - алфа-2-макроглобулин, хаптоглобин, аполипопротеин А1, гама-глутамил транспептидаза, общ билирубин и аланинаминотрансфераза, и дава количествена оценка на фиброзата. FibroTest-ActiTest е използван при деца над 2-годишна възраст и трансплантирани (115). Проучен е при деца с хепатит С, неалкохолна чернодробна болест, муковисцидоза, билиарна атрезия, болест на Wilson, автоимунен хепатит, такива след операция тип Fontan вродена чернодробна фиброза, вертикално инфектирани с HIV (75, 55, 115, 97, 230, 86). Високорисковите профили от фалшиво отрицателни/фалшиво положителни резултати от FibroTest-ActiTest се наблюдават главно при синдром на Жилбер, хемолиза и остро възпаление (218, 109). Несъответствие между FibroTest-ActiTest и биопсията има в 25% от случаите. Половината от тях се дължат на недостатъчен биопсичен материал (218). Откривателите на FibroTest-ActiTest информират, че той е неинвазивен и лесно повторяем и има сравнима диагностична и прогностична стойност, с тази на биопсичния материал (167, 168).

12.5 FibroMax

FibroMax комбинира показателите на FibroTest-ActiTest с нивата на общ холестерол, триглицериди и кръвна захар. Валидиран е при деца над 16 годишна възраст.

12.6 ELF

ELF (Enhanced liver fibrosis, известен още като European liver fibrosis panel) е предложен от Rosenberg и колектив. Изчислява се въз основа на възрастта, хиалуоновата киселина, N-терминал про-пептид от тип III колаген (PCIIINP) и тъканни инхибитори на матрична металопротеиназа (TIMP-1). Първоначално в алгоритъма е включена и възрастта, след което той е опростен и тя е изключена. Чувствителността на ELF за установяване на F3/F4 е 90% (227). ELF има диагностична стойност за оценяване на степента на фиброза при хронични вирусни хепатити, автоимунен хепатит и НАМЧБ, като AUC варира от 0.773 за хроничните вирусни хепатити до 0.98 за НАМЧБ (227, 110, 307). В детска възраст този тест е проучен, единствено при деца с НАМЧБ (195, 7, 283, 311). Goldtschmidt et al. съобщават, че ELF и TE могат да се използват за контрол на лечението при тези деца. Те установяват, че при 39 деца със затлъстяване и нормални трансаминази една година след промяна в начина на живот и редукция на теглото стойностите на чернодробната плътност (TE) и на ELF значимо намаляват. Стойностите на триглицериди също значимо се понижават ($P = 0.02$) за разлика от тези на общия холестерол и LDL-холестерола. Авторите не споменават степента на редукция на теглото (104). Необходими са допълнителни по-големи проучвания.

12.7 Pediatric NAFLD fibrosis index (PNFI)

Nobilli и екип разработват през 2009 г. pediatric NAFLD fibrosis index (PNFI) за оценка на чернодробната фиброза. Изводите им са направени въз основа на 203 деца с хистологична верифицирана НАСБ, като 140 са имали фиброза. PNFI се основава на възрастта, коремната обиколка и стойностите на триглицеридите. Стойност ≥ 9 определя фиброза, а ≤ 3 я отхвърля (193).

12.8 Pediatric NAFLD fibrosis score (PNFS)

През 2014 г. Alkhourj и колектив създават pediatric NAFLD fibrosis score (PNFS), който включва стойности на АЛАТ, алкална фосфатаза, тромбоцити и ГГТ (гамма-глутамилтрансфераза) (8). Опитът до момента сочи, че PNFI и PNFS, използвани самостоятелно, имат по-ниска диагностична стойност (7, 193, 8). Комбинацията от PNFI и

ELF според опита до момента е добра възможност за определяне на фиброза при деца с НАМЧБ.

13. Генетични полиморфизми при НАМЧБ

Неалкохолната стеатозна болест се счита за многофакторно обусловено заболяване със значима генетична предиспозиция. Няколко проучвания доказват, че определени едно-нуклеотидни полиморфизми, свързани с гените за инсулинова чувствителност, липиден метаболизъм и възпаление/фиброза, могат до такава степен да повлияят чернодробната стеатоза, че да прогресира до НАСХ и цироза (326). Това са носители на *PNPLA3* P148M и *TM6SF2* E167K и *GSKR* (72).

13.1 *PNPLA3* P148M

През 2008 г. Romeo и сътрудници провеждат цялостно геномно проучване (GWAS genome-wide association) сред латиноамериканци, афроамериканци и американци от европейски произход, и откриват, че често срещан генетичен вариант в пататитин подобния фосфолипазен домейн, съдържащ 3 протеина (patatin-like phospholipase domain containing 3 protein *PNPLA3*), се асоциира с натрупване на мазнини в черния дроб (225). Това е първото проучване, което доказва, че замяната на изолевцин с метионин на 148 позиция (P148M, rs738409) в белтъка *PNPLA3*, известен още като адипонутрин, се свързва с увеличен риск от чернодробна стеатоза. Тази асоциация не зависи от индекса на телесна маса, наличие на диабет, прием на алкохол и произход. Освен това авторите наблюдават повишени стойности на АЛАТ сред латиноамериканците, носители на *PNPLA3*. Това революционно проучване подтиква изследователите активно да търсят връзката между генетични полиморфизми и развитието на стеатоза, както и между полиморфизмите и по-бързата еволюция във фиброза и цироза при лица с хронични чернодробни заболявания.

Макар и да са изминали 10 години от това откритие, точният механизъм, по който *PNPLA3* довежда до стеатоза, фиброза и увеличен риск от развитие на хепатоцелуларен карцином, не е напълно изяснен.

При хората *PNPLA3* се експресира в различни тъкани, но основно в черен дроб и ретина (215). В по-голяма степен протеинът се намира в чернодробните стелатни клетки в сравнение с хепатоцитите (215). На клетъчно ниво *PNPLA3* се локализира в ендоплазмения ретикулум и мембраните на мастните клетки (114, 41).

Генната му експресия се влияе значително от приема на хранителни вещества (123). На транскрипционно ниво експресията на *PNPLA3* се стимулира от инсулина (71, 133, 114) и се потиска от нивото на вътреклетъчния ретинол (215). В лабораторни условия *PNPLA3* проявява основно липазна (хидролизна) активност спрямо триглицериди и ретинилови естери в стелатни клетки (114, 122, 128, 144). Ензимната му активност е най-висока към триглицериди, съдържащи мононенаситени и полиненаситени мастни киселини (215, 122). През 2014 г. това се потвърждава от Huysalo и сътрудници. Те доказват, че носителите на *PNPLA3* P148M имат по-ниски нива на омега-9 мастни киселини в сравнение с носители на нормалния вариант *PNPLA3* 148P (125). Nobili и екип установяват при деца с НАМЧБ, че носителите на *PNPLA3* P148M алел имат по-слаб ефект от лечението с омега-3 мастни киселини (DHA) спрямо носители на нормалния вариант *PNPLA3* 148P. Ефектът от лечението се оценява по степента на редукция на хиперехогенността на черния дроб, установена чрез коремна ехография, нормализиране/понижаване стойностите на АЛАТ и повишаване на серумните стойности на триглицеридите. Хомозиготите по *PNPLA3* P148M се характеризират с по-тежка стеатоза спрямо хетерозиготите (194). Мултиетническо проучване при 127 деца с НАМЧБ установява, че само при хомозиготите по *PNPLA3* P148M приемът на високо отношение омега-6/омега-3 мастни киселини се асоциира с повишено отлагане на мазнини в черния дроб и високите стойности на АЛАТ (239).

При мишки He и сътрудници, доказват че субституцията на изолевцин с метионин на 148 позиция води до загуба на ензимна функция на *PNPLA3* протеина и натрупване на триглицериди в хепатоцитите (114). Smagris и колектив потвърждават техните резултати, но само при мишки на диета с високо съдържание на рафинирана захар (263). Следователно освен генетичната предразположеност от голямо значение са и факторите на околната среда.

При хора наличието на *PNPLA3* P148M алел води не само до натрупване на триглицериди в черния дроб, но и до намалена чернодробна секреция на липопотеини с много ниска плътност (VLDL) (214). Нормално черният дроб се освобождава от мазнините, като секретира VLDL, при хора с *PNPLA3* P148M алел този процес също е нарушен и допринася за отлагането на липиди (214).

В стелатните клетки *PNPLA3* катализира хидролизата на ретиниловите естери (215). Проучване при пациенти с НАМЧБ и *PNPLA3* I148M алел съобщава за ниски серумни концентрации на свободен ретинол и ретинол-свързващ белтък (181). Резултати от чернодробни биопсии при хомозиготни носители на *PNPLA3* I148M показват висока вътреклетъчна концентрация на ретинол (139). Вероятно патологичният вариант е с нарушена функция и в стелатните клетки, което причинява задържане на ретинол. При хронично възпаление стелатните клетки се трансформират от спящи ретинол-съдържащи клетки в подобни на миофиброластни клетки, секретират необходимия колаген за чернодробната фиброза (117). Едновременно с това те отделят и натрупания ретинол. Той е мастноразтворим микронутриент, който влияе на клетъчната пролиферация и диференциация (84) и е протективен фактор срещу чернодробен карцином (188). *In vitro* проучвания при свръхекспресия на *PNPLA3* I148M протеин в човешки клетъчни линии регистрира 1,75 пъти по-висока концентрация на млечна киселина (178). Това предполага преминаване към анаеробен метаболизъм и митохондриална дисфункция, което е характерно за много туморни клетки (138). Друго проучване открива, че отношението лактат-пируват е значително повишено при хомозиготи по *PNPLA3* I148M (268). Това е показател за хипоксия, митохондриална дисфункция и оксидативен стрес. Дали *PNPLA3* I148M вариантът способства за чернодробната карциногенеза, създавайки благоприятна среда от стеатоза, възпаление и фиброза, или по специфичен начин отключва този процес, все още не е изяснено. Но значителен брой проучвания случаи-контроли и метаанализи при алкохолици с цироза, носители на *PNPLA3* I148M, докладват за увеличен риск от хепатоцелуларен карцином (79, 192, 293, 111, 294, 260, 233). Пациенти, носители на *PNPLA3* I148M, с НАМЧБ също имат по-висок риск да развият тумор (156). Резултатите при пациенти, носители на *PNPLA3* I148M, с хепатит С и карцином са противоречиви. Докато две малки случаи-контроли проучвания съобщават за положителна асоциация между *PNPLA3* I148M и чернодробния карцином (301, 50), други две не откриват такава (79, 139). Аналогична е ситуацията и при пациентите на *PNPLA3* I148M с хепатит С и карцином (34).

13.1.1 *PNPLA3* и НАМЧБ

През 2009 г. Sookoian и екип потвърждават резултати, съобщени от Romeo, като откриват и връзка между наличието на *PNPLA3* I148M и хистологичната активност,

включително и с неалкохолен стеатохепатит (267). След тях и други колективи доказват асоциация между *PNPLA3* P148M стеатозата и сериозна чернодробна увреда, обхващаща целия спектър на НАМЧБ (299, 271, 228). Въпреки че НАМЧБ се счита за чернодробна проявява на метаболитния синдром, повечето проучвания не откриват връзка между *PNPLA3* P148M и ИТМ, серумните липиди или гликемичните показатели (225, 271, 272). Но Palmer и сътрудници съобщават за асоциация между полиморфизма и инсулиновата резистентност (200), а други автори за ниски нива на серумни триглицериди на гладно при пациенти с високостепенно затлъстяване и такива от азиатски произход (281, 286).

Какво показват проучванията при деца с НАМЧБ? До момента са известни резултатите 8 педиатрични изследвания и 2 смесени - деца и възрастни (228, 205). Използваните методи са абдоминална ехография, магнитен резонанс, протонна магнитно-резонансна спектроскопия, не при всички степенята на чернодробна стеатоза и увреждане е оценявана хистологично (228, 298). При 894 възрастни и 223 деца с хистологично доказана НАМЧБ Rotman и екип доказват връзката между *PNPLA3* P148M и наличието на портално и лобуларно възпаление, телца на Mallory-Denk и фиброза (228). При изследваните деца доминира стеатозата в сравнение с фиброзата, последната е лека, предимно портално. Неалкохолен стеатохепатит се среща по-рядко. Друга интересна асоциация в педиатричната популация с гранична статистическа достоверност ($p=0.054$) е връзката между наличието на *PNPLA3* P148M алел и по-ранното извършване на чернодробна биопсия (по-ранно клинично изявяване на НАМЧБ). Проспективно проучване, обхващащо 149 деца и юноши, носители на *PNPLA3* P148M, с НАМЧБ, потвърждава връзката на полиморфизма с наличието на фиброза от биопсия, независимо от всички други фактори (298). Останалите педиатрични проучвания съобщават за връзка между *PNPLA3* P148M и повишени стойности на АЛАТ (154, 305, 226) и АСАТ (226), чернодробна стеатоза (106, 238) и нисък HDL-C (106), повишено натрупване на мазнини в черния дроб при високовъглехидратна диета (53), но без такава с глюкозния толеранс, инсулинова чувствителност (226) и повишена инсулинова резистентност (238). И Peterson и сътр. намират връзка при здрави слаби азиатци от индийски произход между полиморфизма и чернодробна стеатоза, както и повишена инсулинова резистентност в сравнение с други раси (европейска, латиноамериканска, афроамериканска и източни азиатци) (205).

За първи път в България през 2019 г. Карамфилова и сътрудници изследват ролята на *PNPLA3* P148M полиморфизма при 208 възрастни пациенти с НАМЧБ. От тези пациенти 83 са с преддиабетно състояние, а 125 - без. Носителството на патологичния алел в сравнение с нормалния вариант корелира с наличието на преддиабет, инсулинова резистентност, дислипидемия и метаболитен синдром. *PNPLA3* P148M полиморфизмът увеличава 9.6 пъти риска от нарушения в обмяната на глюкозата, 3 пъти риска от развитие на метаболитен синдром и 2.1 пъти риска от развитие на инсулинова резистентност. Хомозиготите по патологичния алел имат значително по-високи стойности на АСАТ, АЛАТ и ГГТ в сравнение с носителите на нормалния алел и хетерозиготите. Хомозиготите по патологичния алел, както и хетерозиготите имат значително по-високи стойности на АСАТ (30.27 ± 14.47 ; 21.95 ± 10.95 ; 18.35 ± 6.18 , $p < 0.05$) спрямо носителите на нормалния алел. По отношение на АЛАТ и ГГТ по-високи стойности се наблюдават само при хомозиготите по патологичния алел, но не и при хетерозиготите (131).

13.1.2. *PNPLA3* и хроничен вирусен В и С хепатит

Ролята на *PNPLA3* P148M също е изследвана и при хроничните вирусни хепатити. Проучвания при възрастни с хепатит С вирусна инфекция доказват, че наличието на алела се свързва с развитие на стеатоза (301, 36, 186, 295) и/или фиброза (301, 186, 295). Като пациентите хомозиготи имат по-тежка стеатоза и фиброза спрямо хетерозиготите и носителите на нормалния *PNPLA3* вариант (301, 186, 295). Това предполага автозомно рецесивен начин на унаследяване. De Nikola и екип откриват, че при възрастни, хомозиготи по *PNPLA3* P148M с хепатит С вирусна инфекция по-късната възраст на заразяване се свързва с по-бързо развитие на фиброза в сравнение с по-млада (< 21 г.) (57).

При хронична В вирусна инфекция наличието на *PNPLA3* P148M алел се свързва повече със стеатоза и възпаление, отколкото с развитието на фиброза (304, 34, 324, 202, 290). Като това не зависи от генотипа на вируса (304, 34). През 2017 г. метаанализ, обхващащ 1135 пациенти с хроничен В хепатит, открива връзка между *PNPLA3* P148M алела и развитието на стеатоза, но не и на цироза (100). Изглежда, че този вариант има по-голяма клинична тежест при болести, които сами по себе си водят до стеатоза (НАМЧБ и алкохолна чернодробна болест), в сравнение с вирусни хепатити (270).

13.1.3. *PNPLA3* и алкохолна чернодробна болест (АЧБ)

През 2009 г. Tian и сътрудници доказват връзката между наличието на PNPLA3 I148M алел и развитието на цироза (288). По-късно това се потвърждава от други проучвания и метанализи (280, 292, 40, 233). Освен това наличието на патологичния алел сред пациенти с алкохолна цироза е свързано с по-бърза декомпенсация и по-кратък период на живот без извършване на чернодробна трансплантация (96).

13.1.4 PNPLA3 и други заболявания

Носителството на PNPLA3 I148M при мъже с първичен склерозиращ холангит, доминантна форма на стеноза на жлъчните пътища, е свързано с по-ниска преживяемост (95).

При пациенти с болест на Уилсън, носители на PNPLA3 I148M алел, стеатозата е по-често срещана в сравнение с носители на здравия алел (276).

Пациенти с вируса на човешки имунодефицитен вирус (HIV), хомозиготи по PNPLA3 I148M, имат по-висок риск от развитие на НАСБ и фиброза (184).

Пациенти с наследствена хемохроматоза, хомозиготите по HFE C282Y хемохроматоза и носители на PNPLA3 I148M алел, имат значителна вероятност да развият стеатоза/напреднала фиброза (300).

Носителство на PNPLA3 I148M алел при болни от хронични чревни възпалителни заболявания също се свързва с развитие на стеатоза и повишени стойности на АЛАТ (163).

Проучване, проведено между 899 пациенти, носители на PNPLA3 I148M алел, с различни чернодробни заболявания, намира връзка между наличието на варианта и увеличена чернодробна плътност, измерена с транзиторна еластография (242).

Пациенти с НАМЧБ, носители на PNPLA3 I148M алел, може и да са склонни към по-лесно развитие на стеатоза, неалкохолен стеатохепатит и фиброза, но същевременно с това данни от проучвания сочат, че именно те по-бързо намаляват натрупаните мазнини в черния дроб (255, 254), както и по-бързо нормализират стойностите на АЛАТ (169) при промяна в начина на живот, включващ редуция на висококалорийни храни и умерено спортуване.

13.2 Член 2 на трансмембранната суперфамилия 6 (Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2))

С напредването на генните технологии през 2000 г. е открит за първи път Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2) (37). Едва 14 г. по-късно при хора се открива, че негов вариант E167K (rs58542926) се свързва с увеличени стойности на АЛАТ и по-ниски серумни стойности на алкална фосфатаза (АФ), триглицериди и LDL-холестерол (141). За да докажат ролята на TM6SF2 E167K в патогенезата на НАМЧБ, авторите инжектират рекомбинантен адено-асоцииран вектор в мишки, който да потисне експресията на TM6SF2 (ефект, който се постига при наличие на TM6SF2 E167K алел). Резултатите показват три пъти повече триглицериди в хепатоцитите, понижени стойности на холестерол и триглицериди в серум при непроменени стойности на АЛАТ. Изследваната констелация говори за дефект в секрецията на липопротеини с много ниска плътност на липидите (VLDL).

Човешкият ген за TM6SF2 се локализира върху 19 хромозома и кодира белтък с неясна функция (37). Той се експресира основно в бъбреците, тънките черва и черния дроб, а те са тясно свързани с обмяната на мазнините (141). На клетъчно ниво се намира в ендоплазмения ретикулум и апарата на Голджи (161).

TM6SF2 E167K вариантът води до смяната на гуанин с аденин в нуклеотид 499, а това, от своя страна, на замяната на глутамат с лизин в кодон 167 (E167K). TM6SF2 E167K алелът причинява образуването на протеин с неправилна пространствена конфигурация, който подлежи на апоптоза (141). Проучване при 226 пациенти с хистологично потвърдена НАМЧБ съобщава, че носителите на TM6SF2 E167K алел имат намалено количество мРНК и по-ниска експресия на TM6SF2 белтъка в хепатоцитите (269). Други изследвания показват, че активността на TM6SF2 белтъка е от изключителна важност за секрецията на VLDL (141, 161, 119), както и за серумната активност на АФ (141). Освен това инхибицията на TM6SF2 води до значително намалена експресия на други гени, свързани със синтеза на триглицеридите и чернодробна стеатоза, например PNPLA3, ACS2, DGAT1 и DGAT2 (161). Въпреки това точният механизъм, по който TM6SF2 E167K нарушава секрецията на VLDL, остава неизяснен.

13.2.1. TM6SF2 E167K и НАМЧБ

TM6SF2 е отговорен за регулацията на отделянето на мазнини от черния дроб. Делеция или мутация в неговия ген (TM6SF2 E167K) причинява намалена секреция на

липопротеини (VLDL, ТГ, АРОВ) и мастна инфилтрация на хепатоцитите с голямо количество на триглицериди (10). Sokoian и сътрудници доказват връзка между тежестта на стеатозата, доказана с биопсия, и наличието на TM6SF2 E167K. Като тя не зависи от пола, ИТМ, възрастта, както и наличието на PNPLA3 I148M алел (269). Друго проучване го допълва, като не открива намалена инсулинова чувствителност (330). Според Holmes и екип TM6SF2 E167K се свързва с лекостепенно понижение стойностите на общия холестерол, но не и на HDL-холестерол и ТГ (119). Kim и колектив откриват връзка между TM6SF2 E167K и повишени стойности на среумния тирозин като израз на повишен риск от развитие на диабет тип 2. Освен това установяват и по-ниска секреция на VLDL, по-ниски стойности на холестерол и ТГ в частиците – VLDL и LDL (134).

TM6SF2 E167K се асоциира не само с развитие на стеатоза, но и с напреднала чернодробна фиброза и цироза, независимо от ИТМ, възрастта, тип 2 диабет и наличието на PNPLA3 I148M алел (236, 157). Изследвайки 1201 пациенти с хистологично доказана НАМЧБ, Dongiovanni и колеги установяват, че TM6SF2 E167K се свързва с развитието на неалкохолен стеатохепатит и напреднала фиброза. При засегнатите лица се измерват по-ниски стойности в серум на общия холестерол, АРОВ, триглицериди и по-високи на АСАТ и АЛАТ (67).

За първи път през 2015 г. е изследвана ролята на TM6SF2 E167K при деца със затлъстяване. Авторите съобщават за честота на носителството на алела 8,4 % (85 деца от общо изследвани 1010), като само 1 дете е хомозигот. Освен за TM6SF2 E167K пациентите са изследвани и за PNPLA3 I148M. Независимо от носителство на PNPLA3 I148M, TM6SF2 E167K се свързва с повишена честота на стеатоза (оценена ехографски), повишени стойности на АЛАТ (> 40 U/ml), по-ниски стойности на общия холестерол, LDL, не LDL холестерол и ТГ. Въпреки това децата, хомозиготи по PNPLA3 I148M и хетерозиготи по TM6SF2 E167K, имат значително по-висок АЛАТ (48 ± 16 U/ml) в сравнение с другите групи (хетерозиготи по двата гена, хетерозиготи и TM6SF2 E167K и носители на нормален вариант на PNPLA3, както тези с нормален генотип и по двата гена). Според авторите двата полиморфизма имат сам по себе си хепатоувреждащ ефект, който в комбинация се допълва (107).

През същата година Mancina и сътр. също доказват при 423 деца с наднормено тегло и затлъстяване, че TM6SF2 E167K се свързва с развитие на стеатоза, по-ниски

стойности на ТГ и общ холестерол. Екипът не открива връзка между полиморфизма и трансминазната активност, както и нарушения във въглехидратния метаболизъм (162).

Goffredo и колеги потвърждават ролята на TM6SF2 E167K за развитието на стеатоза и фиброза при 957 деца със затлъстяване от различни раси – европейска, латиноамериканска и афроамериканска. При 454 от тях е извършена магнитно-резонансно изследване, а при 11 чернодробна биопсия, за да се оцени степента на чернодробна стеатоза и увреда. При европейците и афроамериканците наличието на алела се свързва с чернодробна стеатоза, при латиноамериканците - с повишени стойности на АЛАТ, а при европейците и латиноамериканците - с благоприятен липиден профил, а именно - ниски LDL, VLDL и по-малко плътен LDL. Освен TM6SF2 E167K авторите изследват и следните патологични полиморфизми PNPLA3 I148M и GSKR R446L. Екипът открива синергистичен ефект между тях по отношение развитие на стеатоза (102).

Viitasalo и колектив проучват TM6SF2 E167K сред 462 деца от европейски произход на възраст между 6 и 9 години, като 85% от тях са с нормално тегло. Авторите откриват, че полиморфизмът се свързва с повишени стойности на АЛАТ, по-ниски стойности в серум на общия холестерол, LDL и ТГ, както и по-голяма коремна обиколка (306). Това е първото проучване в детска възраст, което доказва асоциацията на TM6SF2 E167K и лабораторната констелация в популация с предимно нормално тегло.

13.2.2. TM6SF2 E167K и сърдечно-съдови заболявания

Повишените стойности на общия холестерол, LDL и ТГ и по-ниски стойности на HDL са важни рискови фактори за появата на сърдечно-съдови заболявания (29, 327 266-269). Носителите на TM6SF2 E167K варианта имат ниски стойности на серумните липиди. Оказва се, че те са рискови за развитието на НАМЧБ, но същевременно са протектирани от сърдечно-съдови инциденти. Holmen и сътрудници докладват за понижен риск от инфаркт на миокарда при лицата с TM6SF2 E167K алел (119). Друго проучване съобщава за ниски стойности на С-реактивен протеин (137, 60, 28, 143) и ТГ, фактори, асоциирани с по-нисък сърдечно-съдов риск (269). Dongiovanni и колеги изследват TM6SF2 E167K при 427 пациенти с НАМЧБ и сърдечно-съдови заболявания, в това число с инфаркт на миокарда и инсулт, както и при 1819 контроли. Носителите на патологичния алел имат по-малко

каротидни плаки (67), които са силен предсказващ фактор за атеросклероза и сърдечно-съдов риск (204).

13.3.3. TM6SF2 E167K и хронични вирусни хепатити

При хроничен вирусен С хепатит полиморфизмът е изследван през 2015 г. Патологичният вариант е независим рисков фактор за развитие на стеатоза, от PNPLA3 I148M, но не и за тежки възпалителни или фиброзни промени (49). В по-голяма група, обхващаща 815 пациенти, наличието на TM6SF2 E167K освен със стеатоза се асоциира и с възникването на сигнификантна фиброза \geq F2, включително и цироза (F4) (177). Резултатите при коинфектирани пациенти с човешки имунодефицитен вирус са аналогични (232). За разлика от тях Petta и колеktiv не откриват връзка нито между степента на стеатоза, нито на фиброза с наличието на TM6SF2 E167K при 694 пациенти с хепатит С генотип. Но откриват такава между PNPLA3 I148M и тежестта на стеатоза (206).

Ролята на TM6SF2 E167K при хепатит В вирусна инфекция е изследвана само в едно проучване и резултатите са неубедителни (77).

13.3.4 TM6SF2 E167K и алкохолна чернодробна болест

Две проучвания съобщават за повишен риск от развитие на алкохолно обусловена цироза при наличие на TM6SF2 E167K алел (35, 11). Falletti и екип изследват 511 алкохолици с цироза и установяват, че хомозиготите по PNPLA3 I148M и хетерозиготите по TM6SF2 E167K са рискови за хепатоцелуларен карцином (79).

13.4 GSKR P446L

Глюкозо-киназият регулаторен протеин (GSKR) инхибира глюкокиназата, като се конкурира с нейния субстрат, глюкозата. Мутацията в гена за GSKR rs1260326 води до замяна на пролин с лизин на 446 позиция. Дефектният протеин има намалена чувствителност към естествения си регулатор фруктозо-6-фосфат (171, 172, 262) и към глюкокиназата. На гладно той отделя глюкокиназата в ядрото. Това позволява бързо транслокиране в цитоплазмата при хипергликемия, след нахранване (13). Мутантният

протеин GSKR P446L има нисък афинитет към глюकोкиназата, което води до постоянно активиране на глюकोкиназата (25) и увеличен подвоз на глюкоза в хепатоцитите. Вътреклетъчният метаболизъм на глюкозата се задейства. Увеличава се концентрацията на малонил коензим А, субстрат за *de novo* липогенеза, който допринася за 26% от натрупаните мазнини в черния дроб (68). Повишените стойности на малонил коензим А инхибират карнитин палмитоила, което спира оксидацията на мастните киселини (25). Мастните киселини или се превръщат в триглицериди под формата на мастни капки в хепатоцитите, или се секретират като VLDL (118). През 2007 г. Saxena и сътрудници, търсейки полиморфизми, носещи риск за развитие на тип 2 захарен диабет и хипертриглицеридемия, установяват, че GSKR rs780094 се свързва с ниска плазмена концентрация на глюкоза, ниска инсулинова резистентност (НОМА Index), по-нисък риск от развитие ЗД тип 2 и повишени стойности на ТГ в серум (244). Данните са съпоставими, с тези, получени в края на 90-те години при миши модели, ниско ниво глюкоза и високи триглицериди в серум (262, 198, 83). Предполага се, че GSKR rs780094 се унаследява скачено с GSKR rs1260326 (286). Метаанализ върху GWAS проучване при НАМЧБ, обхващащо 7176 лица, намира връзка между GSKR rs780094 натрупване на мазнини в черния дроб (оценено компютър-томографски и хистологично), повишени ТГ и LDL в серум, както и ниски стойности на кръвна захар на гладно и НОМА IR (272). В мултиетническо проучване, обхващащо 3973 лица от афроамерикански и латиномарикански произход, Palmers и колектив установяват, че GSKR rs780094 се асоциира с развитието на чернодробна стеатоза и се среща два пъти по-често при европейци и латиноамериканци в сранение с афроамериканци (201). При 4804 американци от европейски и мексикански произход Hergaез и екип доказват, че наличието на GSKR rs780094 се свързва със стеатоза и повишени стойности на АЛАТ (116). Petta и колектив доказват при 366 биопсирани пациенти с НАМЧБ, че GSKR rs780094 алелът се свързва с развитието на фиброза ($\geq F1$) и повишени ТГ в серум (207). Tan и екип изследват GSKR rs1260326, GSKR rs780094 и PNPLA3 I148M при 144 пациенти с хистологично доказана НАМЧБ и 199 здрави контроли от малайзийски, китайски и индийски произход. Те доказват, че наличието на GSKR rs1260326 или GSKR rs780094 алел се асоциира с възникване на НАМЧБ, НАСХ, както и на НАСХ със сигнификантна фиброза. Хомозиготите по GSKR rs1260326 или GSKR rs780094 алел се характеризират със значима

стеатоза в сравнение с хомозиготите по нормалния алел. Наличието на GSKR rs1260326 или GSKR rs780094 алел не се свързва с лобуларно възпаление, хепатоцити с балонна дегенерация или фиброза от хистологията. Присъствието на патологичен GSKR вариант обуславя възможни нарушения в метаболизма на глюкозата. Затова авторите разделят пациентите на две групи: с НАМЧБ и диабет и с НАМЧБ без диабет, но не откриват статистически значима връзка между GSKR rs1260326 или GSKR rs780094 и диабета. Комбинацията от GSKR rs1260326 или GSKR rs780094 и PNPLA3 I148M увеличава риска от възможно развитие на НАМЧБ (285).

Каква е ролята на GSKR полиморфизмите при деца? През 2012 г. Santoro и колеги изследват GSKR rs1260326 при 455 деца със затлъстяване от европейски, афроамерикански и латиноамерикански произход. Те установяват, че полиморфизмът се свързва с чернодробна стеатоза, повишени стойности на ТГ и големи VLDL в серум. Освен GSKR rs1260326 авторите изследват и PNPLA3 I148M и откриват адитивен ефект по отношение на натрупване на мазнини в хепатоцитите (240). Освен това хомозиготите по GSKR rs1260326 имат по-често метаболитен синдром в сравнение с носителите на непатогения алел (240). Констелацията от повишени стойности на ТГ, големи VLDL в серум и метаболитен синдром предполага и увеличен риск от сърдечно-съдови заболявания, но две проучвания при възрастни с GSKR rs1260326 и високи ТГ не доказват повишен риск от инфаркт на миокарда и исхемична болест на сърцето (302, 140). Три години по-късно Santoro и екип доказват при 14 юноши без или с минимална чернодробна стеатоза, 7 хомозиготи по GSKR rs1260326 и 7 хетерозиготи, повишена чернодробна de novo липогенеза. Пациентите са приемали 75 гр глюкоза с 25 гр фруктоза и вода, маркирана с изотоп Деутерий. Проведена е индиректна калориметрия. De novo липогенезата е оценена чрез вграждане на Деутерия в палмитат, който се съдържа във VLDL. Хомозиготите показват по-висок базален остатъчен енергоразход, по-високи стойности на лактат на гладно (маркер на гликолиза), по-висока оксидация на глюкоза на гладно и по-висока фракционирана de novo липогенеза (237).

През 2014 г. Lin и сътрудници изследват GSKR rs780094 при 797 деца със затлъстяване от Тайван. Носителите на алела се характеризират с по-високи стойности на АЛАТ, ТГ и общ холестерол, независимо от PNPLA3 I148M. Хомозиготите имат 1,997 пъти по-висок риск да развият НАМЧБ (153).

Една година по-късно Eladawy и екип анализират 50 деца в Египет със затлъстяване и НАМЧБ и не откриват статистически значима асоциация между GCKR rs1260326 и клинични и лабораторни показатели. Може би това се дължи на малкия брой изследвани пациенти, както и на факта, че 60% от тях са хомозиготи по нормалния алел (74).

Shen и колеги установяват при 3518 деца и 1773 възрастни от Китай, че GCKR rs1260326 алела се свързва с по-високи стойности на ТГ в серум и по-ниски стойности на инсулин и НОМА-IR, тоест той е протективен срещу инсулинова резистентност (257). При здрави възрастни и деца от китайски произход GCKR rs780094 също се асоциира с високи ТГ (284).

Проучването CASPIAN III обхваща 5528 ученици на възраст 10-18 години от Иран, при които са изследвани различни полиморфизми, свързвани с дислипидемия, включително и GCKR rs780094. На случаен принцип са избрани 550 кръвни проби от участниците. Противно на всички други публикации авторите намират сигнификантно по-ниски стойности на ТГ както при децата хомозиготи по нормалния алел, така и по патологичния GCKR rs780094 (120).

През 2018 г. Hudert и сътрудници изследват 14 вида полиморфизми при 70 деца с хистологично доказан НАМЧБ. Те доказват, че PNPLA3 I148M и GCKR rs780094 се свързват с развитие на НАМЧБ. От хистологичните изследвания най-силна корелация със степента на фиброза имат GCKR rs1260326 и GCKR rs780094. PNPLA3 I148M се асоциира с портална стеатоза, възпалителни промени и фиброза (124).

Освен че е рисков, GCKR rs1260326, аналогично на PNPLA3 I148M, се влияе от начина на хранене. Rousseaux и колеги установяват сигнификантна връзка между GCKR rs1260326, високи стойности на ТГ и високи стойности на омега 3 мастни киселини сред 3528 европейски ученици (HELENA Study). Това предполага, че омега-3 мастните киселини могат да въздейства върху ТГ при пациенти с GCKR rs1260326 (229). Носителите на GCKR rs1260326 с НАМЧБ в сравнение с носителите на нормалния алел реагират по-добре по отношение нивото на кръвната захар, но не и за oxLDL при редукция на теглото след 6 месеца средиземноморска диета и по-нисък калориен прием (130). И двете групи пациенти отчитат статистически значимо намалени стойности на чернодробната плътност, оценена с FibroScan и Shear-wave еластография, понижени

стойности на кръвното налягане, кръвната захар, HbA1c, както и на възпалителните маркери CRP, visfatin и за oxLDL. Чернодробните ензими също са намалени, но не статистически значимо.

14. Заключение

В заключение е важно да се изследва генетичната предразположеност към развитие на стеатоза, стеатохепатит и напреднала фиброза при деца с НАМЧБ и хронични чернодробни заболявания, за да се определят рисковите пациенти. Но носителството на определени полиморфизми не трябва да се възприема като присъда. Даден полиморфизъм, напр. TM6SF2 е рисков за развитие на НАМЧБ и фиброза, но протективен по отношение на риска от сърдечно-съдови заболявания. Носителите на патологични генетични варианти реагират по-бързо и по-добре при промяна в начина на живот и редукция на телесното тегло.

Малкото налични до момента резултати от еластографията и кръвните маркери по отношение на чернодробната фиброза в детска възраст са обнадеждаващи. Те дават възможност по неинвазивен път, особено важен за малките пациенти, да се проследи еволюцията на хроничното чернодробно заболяване. Броят на проучванията с тези маркери е крайно недостатъчен. Това налага необходимостта от извършване на повече, добре структурирани проучвания в детската възраст, които да уточнят диагностичната стойност на еластографията и кръвните маркери за развитие на фиброза при хронични чернодробни заболявания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Целта на дисертационния труд е да се направи ехографска (еластографска) и лабораторна оценка на степента на чернодробната фиброза при деца с хронични чернодробни заболявания.

2. Задачи

За постигане на посочената цел са поставени следните задачи:

1. Да се проучи ролята на Supersonic shear wave еластографията (SSWE) като метод за оценка на чернодробната фиброза при български педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
2. Да се проучи ролята на кръвните маркери – АСАТ/АЛАТ, APRI, FIB-4 и FibroTest-ActiTest като метод за оценка на чернодробната фиброза при български педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
3. Да се определи диагностичната стойност на гореизброените методи за количествено определяне на чернодробната фиброза и да се съпоставят.
4. Да се определят гранични стойности на изследваните показатели за наличие на фиброза ($\geq F1$), сигнификантна фиброза ($\geq F2$) и напреднала фиброза ($\geq F3$).
5. Да се оцени корелацията между изследваните ехографски и лабораторни показатели и чернодробната фиброза, дефинирана хистологично.
6. Да се оцени корелацията между следните показатели: пол, възраст, ИТМ, стойности на АСАТ, АЛАТ, общ и директен билирубин и стойности на еластографията.
7. Да се проучи ролята на генетичните полиморфизми PNPLA3 I148M, TM6SF2 E167K и GSKR R446L за развитието на неалкохолна мастна чернодробна болест при български педиатрични пациенти.
8. Да се изработи алгоритъм за оптимално проследяване на децата с хронични чернодробни заболявания.
9. Да се изработи алгоритъм за оптимално проследяване на децата с неалкохолна мастна чернодробна болест.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Дизайн на проучването

Едноцентрово, проспективно случай-контрола проучване, изследващо ролята на Supersonic shear wave еластографията и кръвните маркери – АСАТ/АЛАТ, APRI, FIB-4 и FibroTest-ActiTest като методи за оценка на чернодробната фиброза в детска възраст в сравнение със златния стандарт - чернодробната биопсия. В групата на пациенти с НАМЧБ да се проучи ролята на генетичните полиморфизми *PNPLA3* I148M, *TM6SF2* E167K и *GSKR* P446L за развитието на болестта.

2. Материал и методи

2.1 Клиничен материал

В проучването са включени 75 пациенти – 34 момичета (44%) и 42 момчета (56%) на възраст под 18 години (табл. 1, фиг. 1), преминали през Клиниката по детска гастроентерология на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ ЕАД, гр. София за периода септември 2016 г. - ноември 2018 г. Средната възраст на участниците е $9,54 \pm 4,97$ години (медианата на възрастта: 10 години; възрастов интервал 3 месеца-17 години) (табл. 2). Участниците са селектирани въз основа на предварително уточнени критерии за включване и изключване.

Критериите за включване са: 1) Здрави доброволци на възраст 0-18 години без никакви оплаквания от страна на черния дроб; 2) Пациенти на възраст 0-18 години с хистологично доказано ХЧЗ; 3) Пациенти на възраст 0-18 години с неалкохолна мастна чернодробна болест, недоказана хистологично.

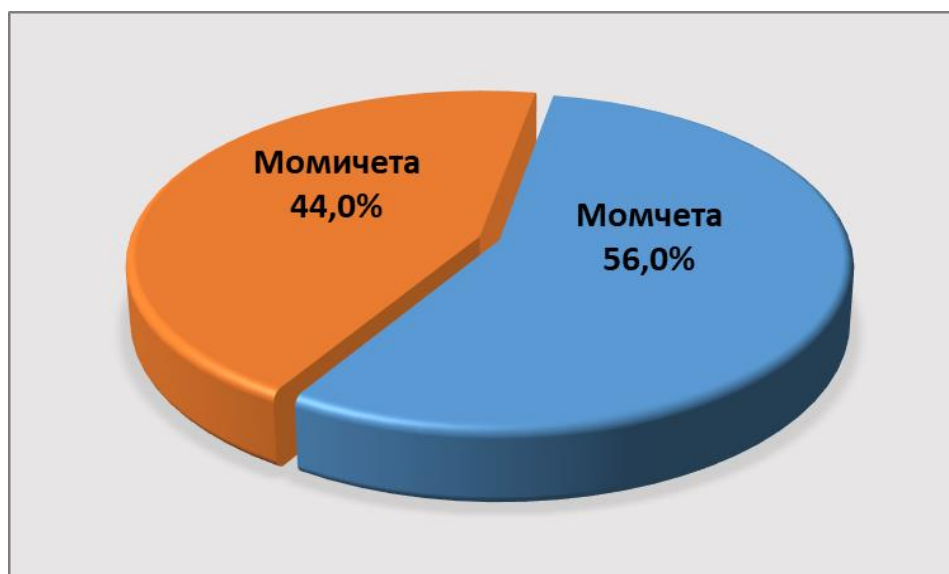
Критериите за изключване са: 1) Наличие на хемолиза, тромбоза на вена порте; 2) Възраст > 18 години.

Избраните участници са разделени в две групи: Група I: Пациенти с ХЧЗ (n=65); Група II: Лица без оплаквания и данни за чернодробно заболяване - здрави контроли (n=10).

В таблица 1 са показани демографските и клиничните характеристики на изследваните групи лица.

Таблица 1: Разпределение на участниците по пол

Пол	N	%	Възраст			
			Mean	SD	Min	Max
Момчета	42	56,00	10,16	5,11	0,25	17,00
Момичета	33	44,00	8,75	4,75	0,33	16,00
Общо	75	100,00	9,54	4,97	0,25	17,00



Фигура 5: Разпределение на участниците по пол

Таблица 2: Разпределение на участниците по възраст

Група	N	%	Възраст			
			Mean	SD	Min	Max
Контроли	10	13,33	10,90	5,22	2,00	17,00
Пациенти	65	86,67	9,33	4,94	0,25	17,00
Общо	75	100,00	9,54	4,97	0,25	17,00

2.2 Биологичен материал

От всеки участник е взета венозна кръв чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. По 2 епруветки от всички деца с 10 мл кръв за FibroTest-ActiTest са изследвани чрез лаборатория „Синево България“ от BioPredictive France. Резултатите от изследването се получават по скалата МЕТАВИР и оценяват степен на фиброза и активност. Взети са и по една епруветка за биохимични изследвания, една епруветка с антикоагулант EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic A) за пълна кръвна картина, една епруветка за хемостаза. При пациентите с НАМЧБ за изолирането на ДНК кръвта е събирана във вакутейнери с EDTA (6 мл), като пробата е вземана до един час след нахранване (във връзка с постпрандиалната левкоцитоза) и съхранявана на +4°C до транспортирането в Генетична медико-диагностична лаборатория „Геника“. Изолирането на ДНК е извършвано не по-късно от 24 часа след вземане. След изолирането на високомолекулна геномна ДНК, тя е съхранявана в разтворено състояние в TE буфер при -20°C в ДНК-банката на Генетична медико-диагностична лаборатория „Геника“.

Вземането, надписването, картотекирането и съхранението на всяка проба е съгласно правилата за добра лабораторна практика и инструкциите на съответния търговски кит, който е използван при анализирането ѝ.

2.3 Методи за уточняване на диагнозата в отделните групи

Във всяка една от групите диагнозата е поставена и уточнена на базата на стандартни клинични и параклинични методи. При всеки един от участниците е снета подробна анамнеза, извършено е физикално изследване и са проведени всички необходими допълнителни изследвания: хематологични, биохимични, имунологични, вирусологични изобразителни и хистологични. При здравите доброволци е снета подробна анамнеза и в Група II са включени само деца без данни за заболявания на черния дроб.

2.3.1 Параклинични методи

А) Пациенти с хронични чернодробни заболявания – Проведени са стандартни биохимични (Аспартатаминотрансфераза (АСАТ), Аланин аминотрансфераза (АЛАТ), Алкална фосфатаза (АФ), Гамаглутамил трансфераза (ГГТ), холестерол, триглицериди (ТГ), общ белтък, албумин, хемостаза), вирусологични, имунологични и т.н. изследвания за уточняване на естеството на чернодробното заболяване. Изследванията са назначени по преценка на лекуващия лекар и са извършени в Клинична лаборатория на СБАЛДБ „Проф. д-р Иван Митев“. Използвани са референтните стойности на лабораторията за съответната възраст и пол с изключение на нормите на АСАТ, АЛАТ, холестерол, HDL-холестерол, LDL-холестерол и триглицериди. Приетите норми за АСАТ и АЛАТ са посочени при начина за изчисляване на индексите APRI и FIB-4. За високи стойности на липидите са използвани, съгласно ревизираните препоръки за скрининг на липиди при деца и юноши (314), следните стойности:

Холестерол >5,18 mmol/l

HDL-Холестерол >1,16 mmol/l <1,036 ниска

LDL-Холестерол >3,36 mmol/l <2,84 mmol/l ниска

ТГ (0-9 г.) >1,13 mmol/l

ТГ (>9 г.) > 1,47 mmol/l

Б) Пациенти с НАМЧБ – При пациентите с НАМЧБ са изследвани чернодробни маркери и ОГТТ по преценка на лекуващия лекар за уточняване на диагнозата. Антропометричните показатели са изчислени с антропометричните калкулатори на Световната здравна организация - Anthroplus 2007 и Anthroplus 2011. Наличието на прехипертония и хипертония е оценявано съгласно Препоръките на Американската

педиатрична академия за скрининг и лечение на високо кръвно налягане при деца и юноши (315).

Изчислен е НОМА индекс по формулата:

$$\text{НОМА-IR} = \frac{\text{кръвна захар } 0' \times \text{инсулин } 0'}{22,5}$$

Резултат $\text{НОМА-IR} \geq 2,5$ се приема за наличие на инсулинова резистентност.

В) Здрави контроли – Изследвани са антропометрични (ръст, тегло, ИТМ) и чернодробни биохимични показатели – АСАТ, АЛАТ, АФ, ГГТ, липиди, които са в норма.

2.3.2 Образни методи

След извършване на конвенционална ехография в В-mode от опитен ехографист (със стаж над 20 г.) при всички пациенти от докторанта се прави и Shear-wave еластография на апарат SuperSonic Imagine Aixplorer. Апаратът е модел 4.2.0. Изполван е конвексен трансдюсер. Хиперехогенността на черния дроб се преценява спрямо ехогенността на десния бъбрек.

2.4 Методи за оценка на фиброзата

2.4.1 Инвазивни методи за оценка на фиброзата

При 70% от участниците е извършена чернодробна биопсия за оценка на степента на фиброза. Пациентите са насочени за чернодробна биопсия от лекуващия лекар и процедурата е извършена в планов порядък след съответното информирано съгласие от страна на родителите. Биопсиите са оценявани от един опитен патолог с над 25 г. стаж. Биопсията се счита за адекватна при наличие на 5 и повече портални пространства. Биопсичният материал е фиксиран във формалин, след това в парафинови блокчета. Последните са оцветени с хематоксилин-еозин и Трихром-Масон за оценка на фиброзата. Степента на чернодробна фиброза е оценена по скалата METAVIR.

Степен на фиброза:

F0: Липсва фиброза

F1: Звездовидно разширение на порталните зони без септи

F2: Звездовидно разширение на порталните зони с няколко септи

F3: Септална фиброза без цироза

F4: Цироза

Степен на активност:

A0: Липсва активност

A1: Лека активност

A2: Умерена активност

A3: Силна активност

2.4.2 Неинвазивни методи за оценка на фиброзата

А) Еластография – При всички участници е проведена Shear-wave еластография след извършване на конвекционална ехография в В-mode. Изследването е извършено от докторанта, като е използван апарат SuperSonic Imagine Aixplorer, модел 4.2.0. Направени са пет измервания с конвексен трансдюсер SC6-1 на гладно, в легнало положение с вдигната и максимално отведена дясна ръка. Измерванията са правени в междуребрентите пространства (5-8) в областта на десния чернодробен дял. При невъзможност (възраст под 5 г. на пациента) - субкостално. По време на изследването децата над 5 г. задържат въздух за няколко секунди, при по-малките изследването е при свободно нормално дишане. При неспокойствие от страна на пациента изследването се извършва по време на сън. Седация не е прилагана. Зоната за еластографското изследване се избира свободна от съдове и сенки от ребрата на дълбочина на 5 см. Изследваната зона е с размери 10 мм. Изчислявана е средна аритметична стойност на чернодробната плътност от еластографското изследване от петте измервания в kPa.

Б) FibroTestActiTest – При всички участници е изследван FibroTest-ActiTest. Той комбинира шест серумни биомаркера с възрастта и пола на пациента - алфа-2-макроглобулин, хаптоглобин, аполипопротеин А1, гама-глутамил трансептидаза, общ билирубин и аланинаминотрансфераза и дава количествена оценка на фиброзата. За целта е взета кръв в две епруветки с Clot activator (2x 5 мл =10 мл). Пробите са изпращани и изследвани чрез лаборатория „Синево“ в лаборатория „Biopredictive“, Франция.

В) APRI

Отношението АСАТ/тромбоцити = APRI е разработено през 2003 г. от Wai и екип по формулата:

$$\text{APRI} = \frac{\text{АСАТ (IU/l)}}{\text{Тромбоцити (10}^9\text{)}} \times 100$$

За норма на АСАТ е прието: над 1г. – под 40 IU/l; под 1г. - под 61 IU/l

Г) FIB-4

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{Годините} \times \text{АСАТ (IU/l)}}{\text{Тромбоцити (10}^9\text{)} \times \sqrt{\text{АЛАТ (IU/l)}}}$$

За норма на АЛАТ е приета: за момчета < 26 IU/l; за момичета < 22 IU/l

Д) Съотношение АСАТ/АЛАТ

2.5 Изследване на генетични полиморфизми в гените *PNPLA3*, *GCKR* и *TM6SF2*, които се асоциират с развитие на НАМЧБ, НАСХ и фиброза

2.5.1 Клиничен материал

Проучването е проведено при 23 пациенти в детска възраст с клинична диагноза неалкохолна мастна чернодробна болест и 10 клинично здрави индивида без данни за чернодробно заболяване на средна възраст $10,53 \pm 3,78$ години.

Обработката на биологичния материал и ДНК анализа са извършени в колаборация с Генетична и медико-диагностична лаборатория „Геника“, гр. София.

Настоящото изследване е финансирано по договор № Д-142, ПРОЕКТ МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ 2017 с вх. № 8542/12.12.2016 г. на МУ-София.

2.5.2 Биологичен материал

За изолиране на генетичен материал от пациентите с неалкохолен стеатозен хепатит и от здравите индивиди се използва 6 мл венозна кръв в епруветка с антикоагулант ЕДТА. Всяка епруветка беше маркирана с името, датата и с идентификационен номер на пациента, с който той участва в изследването. За всички пациенти, участващи в изследването беше подписано информирано съгласие от техен законен настойник, одобрено от етичната комисия към СМН, МУ-София.

2.5.3 Методи

2.5.3.1 Преданалитична обработка на материала

2.5.3.1.1 Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солевия метод описан от Miller et al., 1988.

Принцип:

- разрушаване на червените кръвни клетки;
- утаяване на ядрените клетки;
- разрушаване на ядрените клетки;
- преципитация на белтъците;
- преципитация на ДНК.

Буфери използвани за изолирането на ДНК:

Лизис буфер (pH=7.4): NH_4Cl - 155mM; KHCO_3 – 10mM; Na_2EDTA – 0.1mM

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM; Na_2EDTA – 25 mM

TE буфер (pH=7.4): TRIS/HCl (pH=7.4) – 10mM; EDTA (pH=8.0) – 1mM

Апаратура:

Центрофуга Hermle, Germany, центрофуга MiniSpin Eppendorf ; вортекс Heidolph Reax Top; термостат Memmert, Germany

2.5.3.1.2 Оценка на качеството на изолираната ДНК

Оценката на качеството на изолираната ДНК се извърши чрез електрофоретично разделяне на геномната ДНК в агарозен гел.

Апаратура:

Спектрофотометър BioPhotometer, Eppendorf.

2.5.3.2 Аналитична обработка на материала

2.5.3.2.1 Полимеразна верижна реакция (ПВР, Polymerase Chain Reaction, PCR)

Принцип:

Полимеразната верижна реакция (ПВР) е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулната диагностика. Състои се в *in vitro* ензимно размножаване (амплификация) на избрани ДНК нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции (т. нар. зародиши или праймери). Методът е разработен от Kary Mullis през 1985 г. Продължителността на ПВР зависи от нуждите на експеримента, дължината и специфичността на размножавания участък. След всеки цикъл количеството на матрицата ДНК нараства в геометрична прогресия. В резултат на 30 такива цикъла се получава около 10^6 - 10^8 копия от избрания участък.

2.5.3.2.2 Намножаване на специфични участъци от *PNPLA3*, *GSKR* и *TM6SF2* гените

В настоящото изследване за ензимното размножаване с ПВР на специфични участъци от *PNPLA3*, *GSKR* и *TM6SF2* гените бяха използвани праймерни секвенции по дизайн на ГМДІ „Геника“. Големината на получените фрагменти и оптималната температура на анилинг са представени в таблица 3.

Таблица 3: Изследвани генетични варианти, големина на получените фрагменти и оптималната температура на анийлинг

Ген	Генетичен вариант кДНК, АК	Размер на продукта(б.дв.)	T _(опт.) (°C)
<i>PNPLA3</i>	c.444C>G, p.I148M	333 б.дв.	60
<i>GCKR</i>	c.1337C>T, p.P446L	488 б.дв.	60
<i>TM6SF2</i>	c.499C>T, p.E167K	485 б.дв.	62

Оптимална концентрация на компонентите, участващи в полимеразната верижна реакция за размножаване на изследваните участъци от *PNPLA3*, *GCKR* и *TM6SF2* гените, е: 10xбуфер Prime (20mM MgCl₂) (GENET BIO, Chungnam, Korea), разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea), праймер F/R (10pmol/μl), термостабилна полимераза Prime Taq (5U/μl), (GENET BIO, Chungnam, Korea), ДНК (20ng/μl) и дестилирана вода до краен обем на реакционната смес 25μl. Условиата за амплификация на изследваните ДНК фрагменти са оптимизирани в ГМДЛ „Геника“.

Оптималната програма за провеждане на ПВР за размножаване на изследваните участъци от *PNPLA3*, *GCKR* и *TM6SF2* гените е:

Таблица 4: Оптималната температура на хибридиране на праймерите

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94 ⁰ C	5 min	1
Денатурация	94 ⁰ C	30 sec	35
Хибридизация на праймерите	T _{опт} °C	30 sec	
Синтез на нова верига	72 ⁰ C	30 sec	
Краен синтез	72 ⁰ C	5 min	1

Оптималната температура на хибридиране на праймерите (T_{опт}) е различна за отделните фрагменти и е посочена в таблица 4. Количеството и качеството на получените

продукти чрез ПВР беше контролирано посредством агарозна гел-електрофореза. Използва се 3% агарозен гел, хоризонтална електрофорезна система.

Апаратура:

За провеждане на PCR са използвани апарати: GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China.

2.5.3.2.3 Директно секвениране на намножените фрагменти

Секвенирането е ензимен метод за определяне на нуклеотидната последователност на участък от ДНК. Използва се реакция за синтез *in vitro* на ДНК вериги върху едноверижна матрица с участието на ДНК полимераза. Полимеразната реакция се инициира на точно определено място, където синтетични олигонуклеотидни зародиши (праймери) хибридизират с матрицата.

Полученият амплификационен продукт е необходимо най-напред да бъде пречистен от останалите дезоксинуклеотидтрифосфати и праймери, които биха повлияли по-нататъшните реакции. Използва се ExoSAP-IT® кит за ензимно пречистване, съдържащ ензимите екзонуклеаза I и алкална фосфатаза. Предимство на ензимния метод на пречистване е, че няма никакви загуби на продукт при процедурата, използва се много малко количество матрица, процедурата е бърза и лесна за изпълнение.

Самата секвенционна реакция се извършва посредством кит за секвениране BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA), включващ Thermo Sequenase II ДНК-полимераза и флуоресцентно белязани нуклеотиди.

Секвенционните продукти се преутаяват чрез преципитация с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Получената суха утайка се разтваря в Hi-Di формамид. Така приготвената проба е готова за анализ и се подава на апарата за електрофоретично разделяне (автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer).

Получените данни се обработват автоматично от програма ABI3130 Data Collection Software и се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

Апаратура:

За провеждането на полимеразната верижна реакция, ензимното пречистване на получения продукт и последващата секвенционна реакция са използвани апарати GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China.

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.6 Статистически методи

За обработка и анализ на данните са използвани следните статистически методи:

2.4.1 Дескриптивна статистика

- средна аритметична, медиана – мерки за оценка на централната тенденция;
- стандартно отклонение – мярка за оценка на разсейването;
- честотни таблици - *абсолютни честоти* – броят на единиците в отделно взета група; *относителни честоти* – броят на единиците в отделно взета група отнесен към общия брой единици в съвкупността;

2.4.2 Хи-квадрат на Пирсън (Chi-square test) - използва се в случаите, когато се изследва зависимост между описателни данни с две или повече категории. Тестът се основава на кръстосана таблица (таблица на спрегнатост). Точен тест на Фишер (Fisher's exact test) - когато повече от 20% от клетките в таблицата на спрегнатост имат очаквани честоти по-малки от 5 и/или някоя клетка има очаквана честота по-малка от 1.

2.4.3 Тест на Колмогоров-Смирнов при една извадка (One-Sample Kolmogorov-Smirnov test) – използва се за проверка на формата на честотното разпределение. Най-често проверката е спрямо формата на нормалното разпределение.

2.4.4 Непараметричен тест на Кръскал-Уолис (Kruskal-Wallis Test) – при сравняване на повече от две независими групи – използва се при рангови данни или когато формата на честотното разпределение е различна от формата на нормалното разпределение.

2.4.5 Непараметричен тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney test) при сравняване на две независими групи – използва се при рангови данни или когато формата на честотното разпределение е различна от формата на нормалното разпределение.

2.4.6 Рангов корелационен коефициент на Спирмън (Spearman's rho) – при рангови данни или в случаите, когато формата на честотните разпределения на изследваните променливи е различна от формата на нормалното разпределение.

2.4.7 ROC (Receiver Operating Characteristic Analysis) – анализ - за оценка на диагностичните възможности на изследваните показатели. Дава възможност да се

определи онази прагова стойност на показателя, при която с най-голяма вероятност се класифицират случаите като болни или здрави.

Избраното критично ниво на значимост е $\alpha=0,05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка от α . За обработка на данните от проучването е използван специализираният статистически пакет SPSS версия 13.0. Статистическият анализ е изготвен с помощта на доц. Тодор Кундурджиев, д.м. – преподавател в катедра „Трудова медицина“ на Факултета по обществено здраве при Медицински университет – София.

IV. РЕЗУЛТАТИ

Задача 1, 2 и 3

В групата на пациенти с хронични чернодробни заболявания са включени 65 деца - 28 момичета (44%) и 37 момчета (56%). Средна възраст $9,33 \pm 4,94$ години. В таблици 5 и 6 и фигури 6 и 7 са представени демографските, хистологичните и лабораторните показатели на участниците в проучването.

Таблица 5: Резултати от антропометрични, лабораторни и неинвазивни показатели при пациентите с ХЧЗ

Пациенти						
Показател	N	Mean	Median	SD	Min	Max
Възраст	65	9,33	9,00	4,94	0,25	17,00
Ръст	65	136,21	145,80	33,90	50,00	186,00
ИТМ Ре	65	63,70	77,80	37,39	0,30	99,90
АСАТ	65	140,43	42,00	378,52	14,00	2901,00
АЛАТ	65	154,37	66,00	318,28	11,00	2179,00
ГГТ	65	115,74	31,00	236,05	5,00	1430,00
АФ	65	292,38	241,00	190,25	53,00	1241,00
Тромбоцити	65	275,32	267,00	100,66	68,00	779,00
aPTT	65	34,93	34,65	5,34	26,00	52,70
INR	65	1,00	0,94	0,25	0,70	2,47
Протромбиново време	65	13,84	13,30	2,76	10,30	30,00
Общ белтък	65	73,29	73,05	9,46	43,20	92,80
Албумин	65	45,25	45,70	4,90	27,55	52,30
Shear-wave	65	9,05	6,00	7,04	4,00	37,30
APRI	65	1,62	0,38	4,99	0,11	38,78
FIB-4	65	0,32	0,17	0,41	0,00	2,00
АСАТ/АЛАТ	65	0,88	0,79	0,40	0,28	1,92

Таблица 6: Резултати от антропометрични, лабораторни и неинвазивни показатели при контролите

Контроли						
Показател	N	Mean	Median	SD	Min	Max
Възраст	10	10,90	12,00	5,22	2,00	17,00
Ръст	10	147,25	157,50	30,22	87,50	187,00
ИТМ, Ре	10	60,60	64,35	25,07	10,80	86,30
АСАТ	10	18,50	18,50	3,72	14,00	26,00
АЛАТ	10	11,50	10,50	3,14	7,00	17,00
ГГТ	10	11,50	10,00	5,21	7,00	25,00
АФ	10	160,60	166,00	66,74	71,00	243,00
Тромбоцити	10	284,00	262,00	105,24	133,00	466,00
aPTT	10	33,89	33,15	3,12	30,50	40,30
INR	10	1,06	1,04	0,08	0,97	1,20
Протромбиново време	10	14,17	13,85	1,36	12,00	16,50
Общ белтък	10	70,66	70,25	5,96	62,80	82,00
Албумин	10	47,73	47,78	3,31	42,70	52,02
Shear-wave	10	4,43	4,37	0,46	3,88	5,44
APRI	10	0,18	0,15	0,08	0,10	0,34
FIB-4	10	0,24	0,23	0,14	0,03	0,51
АСАТ/АЛАТ	10	1,67	1,73	0,39	1,17	2,22

Таблица 7: Разпределение на пациентите според диагнозата им

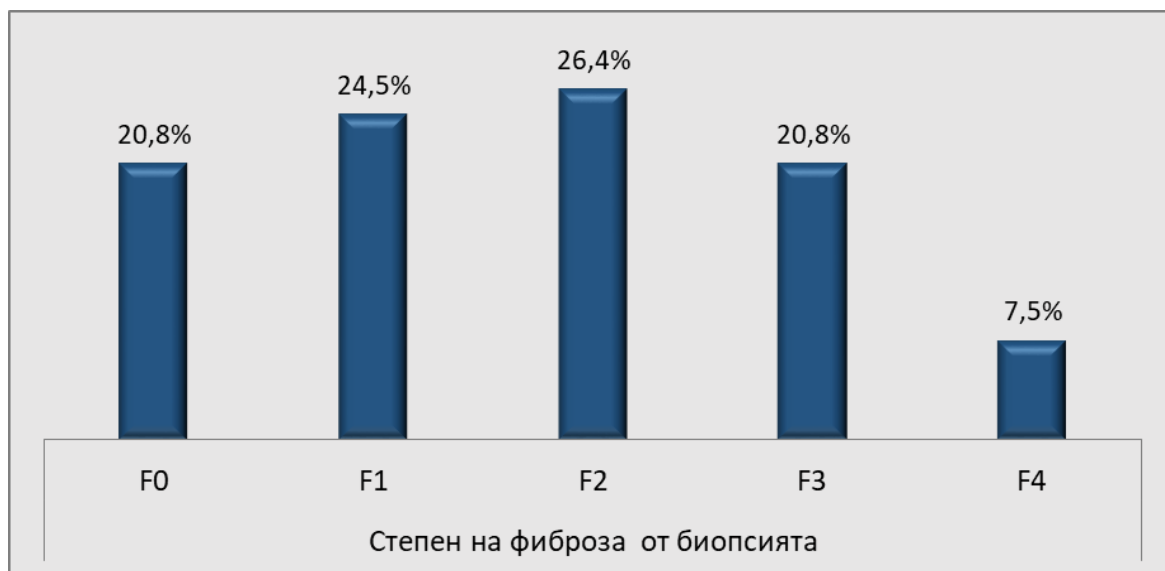
Диагноза	N	%	Възраст			
			Mean	SD	Min	Max
Хр. Вирусни хепатити (HBV; HBV+HDV;HCV)	13	17,33	12,23	3,81	5,00	16,00
Автоимунен хепатит	9	12,00	8,44	4,82	2,00	16,00
НАМЧБ	22	29,33	10,36	3,06	4,00	17,00
Билиарна атрезия	3	4,00	0,36	0,13	0,25	0,50
Метаболитни хепатопатии	8	10,67	10,38	5,45	2,00	17,00
Наличие на трансплантиран черен дроб	2	2,67	8,50	4,95	5,00	12,00
Други	8	10,67	5,28	5,99	0,33	15,00
Контрола	10	13,33	10,90	5,22	2,00	17,00
Общо	75	100,00	9,54	4,97	0,25	17,00

Разпределението на пациентите спрямо диагнозата им е следното – 30,7% са с НАМЧБ, 17,3% с хронични вирусни хепатити (HBV, HBV+HDV, HCV), 12% с автоимунен хепатит, 9,3% метаболитни хепатопатии, 4,0% билиарна атрезия, 2,7% с наличие на трансплантиран черен дроб, при 10% етиологията не е установена (табл. 7, фиг. 6).



Фигура 6: Разпределение на пациентите според диагнозата им

При 53 от децата с ХЧЗ (81,5%) е извършена чернодробна биопсия с диагностична цел и за оценяване степента на чернодробната фиброза. Разпределението на пациентите спрямо степента на чернодробната фиброза е следното: 11 пациенти (20,8%) нямат фиброза, 13 (24,5%) имат лека фиброза (F1), 14 (26,4%) значима фиброза (F2), 11 (20,8%) напреднала фиброза (F3) и 4 (7,5%) са с цирроза (F4) (фиг.7).



Фигура 7: Разпределение на пациентите (n=53) спрямо степента на фиброза, определена от хистологичното изследване

Таблица 8: Разпределение на средните стойности на неинвазивните маркери на фиброза при пациентите с проведена биопсия (n=53), разделени в 2 групи – без фиброза (F0) и с фиброза ($\geq F1$), и контролите

Фиброза	Показател	N	Mean	Median	SD	Min	Max
Не	Shear-wave	11	5,43	5,10	0,83	4,46	7,00
	APRI	11	0,39	0,36	0,23	0,15	0,81
	FIB-4	11	0,14	0,13	0,10	0,01	0,35
	АСАТ/АЛАТ	11	0,67	0,61	0,32	0,28	1,18
	FibroTest	10	0,15	0,14	0,10	0,03	0,32
	ActiTest	10	0,49	0,54	0,21	0,16	0,80
Да	Shear-wave	42	11,12	7,20	8,04	4,00	37,30
	APRI	42	2,35	0,53	6,11	0,12	38,78
	FIB-4	42	0,42	0,23	0,48	0,00	2,00
	АСАТ/АЛАТ	42	0,89	0,78	0,39	0,43	1,92
	FibroTest	40	0,42	0,26	0,34	0,05	0,99
	ActiTest	40	0,56	0,59	0,32	0,05	1,00
Контроли	Shear-wave	10	4,43	4,37	0,46	3,88	5,44
	APRI	10	0,18	0,15	0,08	0,10	0,34
	FIB-4	10	0,24	0,23	0,14	0,03	0,51
	АСАТ/АЛАТ	10	1,67	1,73	0,39	1,17	2,22
	FibroTest	10	0,16	0,15	0,11	0,02	0,40
	ActiTest	10	0,05	0,04	0,02	0,03	0,08

Таблица 9: Разпределение на средните стойности на неинвазивните маркери на фиброза при пациентите с проведена биопсия (n=53), разделени в 2 групи – без фиброза (F0) и с фиброза (\geq F1), и контролите. Mann-Whitney Test.

	Фиброза-Не	Фиброза-Не	Фиброза-Да
	Фиброза-Да	Контроли	Контроли
	p	p	p
Shear-wave	0,006	0,004	<0,001
APRI	0,032	0,017	<0,001
FIB-4	0,017	0,057	0,561
АСАТ/АЛАТ	0,119	<0,001	<0,001
FibroTest	0.026	0.850	0.051

Средните стойности на чернодробната плътност, APRI скората и FIB-4 при пациентите със фиброза са значимо по-високи спрямо тези без фиброза ($11,12 \pm 8,04$ vs. $5,43 \pm 0,83$, $p=0,006$), ($2,35 \pm 6,11$ vs. $0,39 \pm 0,23$, $p=0,032$), ($0,42 \pm 0,48$ vs. $0,14 \pm 0,10$, $p=0,017$). Няма статистическа значима разлика между стойностите на отношението АСАТ/АЛАТ при пациентите с и без фиброза ($0,89 \pm 0,39$ vs. $0,67 \pm 0,32$, $p=0,119$). Стойностите на чернодробната плътност, APRI скората и отношението АСАТ/АЛАТ при пациентите с фиброза (\geq F1) спрямо тези при контролите са значимо по-високи ($11,12 \pm 8,04$ vs. $4,43 \pm 0,46$, $p < 0,001$), ($2,35 \pm 6,11$ vs. $0,18 \pm 0,08$, $p < 0,001$), ($0,89 \pm 0,39$ vs. $1,67 \pm 0,39$, $p < 0,001$). Няма статистическа разлика в стойностите на FIB-4 при пациентите с фиброза (\geq F1) и при контролите ($0,42 \pm 0,48$ vs. $0,24 \pm 0,14$, $p=0,561$) (табл. 8, 9).

Таблица 10 и фигура 8 показват способността на всеки тест да разграничава наличието на фиброза (\geq F1) от липсата на такава (F0). Най-голяма площ под кривата (AUC) има Shear-wave еластографията 0,773 (SE 0,063, $p=0,006$, 95% CI 0,649-0,896), последвана от FIB-4 AUC 0,736 (SE 0,076, $p=0,017$, 95% CI 0,587-0,885), APRI AUC 0,712 (SE 0,079, $p=0,032$, 95% CI 0,557-0,868) и FibroTest-ActiTest AUC 0,709 (SE 0,073, $p=0,034$, 95% CI 0,566-0,851). Отношението АСАТ/АЛАТ не може да отдиференцира наличието от липсата на фиброза ($p=0,119$). На таблица 9 са показани граничните стойности, над които имаме фиброза (\geq F1). При cut-off стойност $\geq 5,86$ kPa от еластографското изследване е на лице фиброза (\geq F1) с чувствителност 76,2% и специфичност 72,7%. Следва FIB-4 с cut-off 0,15, с чувствителност 76,2% и специфичност 63,6%. При $\geq 0,40$ за APRI с чувствителност

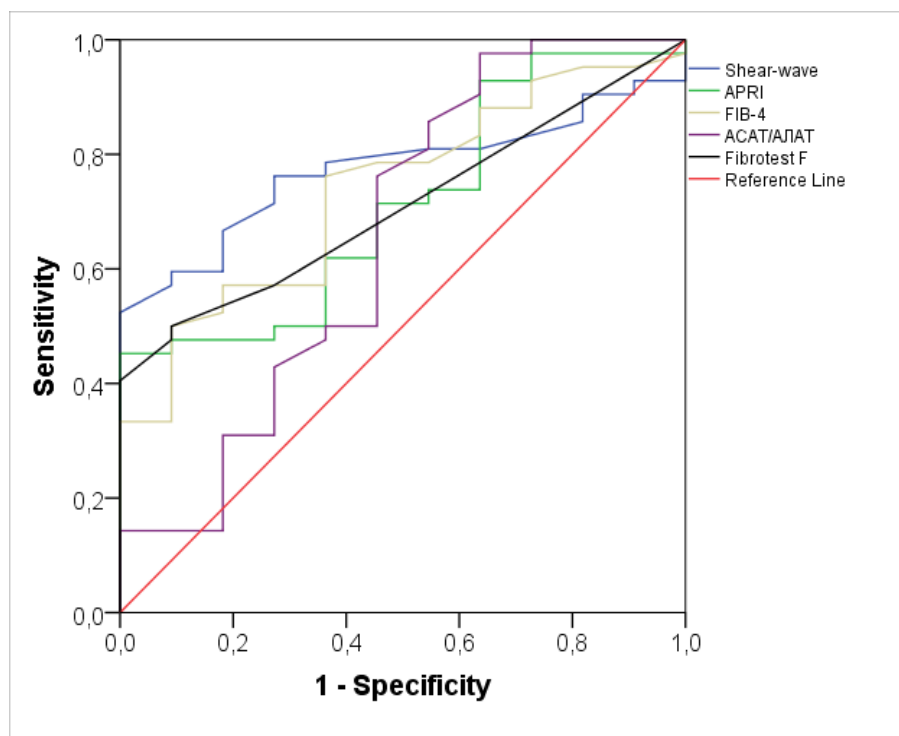
61,9% и специфичност 63,6%. За FibroTest е използван cut-off F0 с чувствителност 57,1% и специфичност 72,7% (табл. 11) .

Таблица 10: ROC анализ по отношение на групите с липса (F0) и наличие на фиброза (\geq F1)

Показател	AUC	SE	p	95% CI	
Shear-wave	0,773	0,063	0,006	0,649	0,896
APRI	0,712	0,079	0,032	0,557	0,868
FIB-4	0,736	0,076	0,017	0,587	0,885
АСАТ/АЛАТ	0,654	0,107	0,119	0,445	0,863
Fibrotest	0,709	0,073	0,034	0,566	0,851

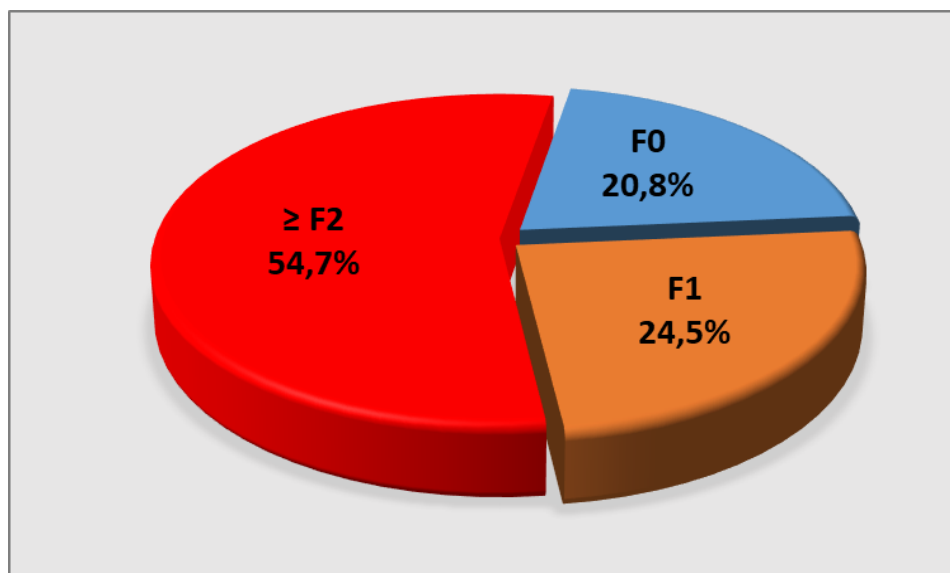
Таблица 11: Cut-off стойности за наличие на фиброза (\geq F1)

Показател	Cut-off	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV
Shear-wave	5,86	0,762	0,727	0,444	0,914
APRI	0,40	0,619	0,636	0,304	0,867
FIB-4	0,15	0,762	0,636	0,412	0,889
АСАТ/АЛАТ	0,72	0,548	0,545	0,240	0,821
Fibrotest	F0	0,571	0,727	0,307	0,889



Фигура 8: ROC анализ по отношение на групите с липса (F0) и наличие на фиброза (\geq F1)

Освен спрямо липса на фиброза (F0) и наличие на фиброза (\geq F1) децата с ХЧЗ се разделиха и на такива със сигнификантна фиброза (\geq F2) и със напреднала фиброза (\geq F3). В таблици 12 и 13 и фигура 10 е представена способността на различните неинвазивни маркери да разпознават сигнификантна фиброза (\geq F2) от несигнификантна фиброза ($<$ F2) със съответната площ под ROC кривата, специфичност и сензитивност. Най-голяма площ под кривата (AUC) има Shear wave еластографията 0,888 (SE 0,047, $p < 0,001$, 95% CI 0,795-0,980), последвана от FibroTest AUC 0,808 (SE 0,061, $p < 0,001$, 95% CI 0,688-0,928), APRI AUC 0,778 (SE 0,065, $p = 0,001$, 95% CI 0,651-0,906) и FIB-4 AUC 0,735 (SE 0,071, $p = 0,004$, 95% CI 0,596-0,873). Отношението АСАТ/АЛАТ не може да разграничи сигнификантна фиброза (\geq F2) ($p = 0,210$). При cut-off стойности от еластографията $\geq 6,16$ kPa със чувствителност 82,8% и специфичност 82,6% е на лице сигнификантна фиброза. За APRI и FIB-4, това са съответно 0,45 (чувствителност 82,8% и специфичност 82,6%) и 0,21 (чувствителност 82,8% и специфичност 82,6%) (табл. 15).



Фигура 9: Разпределение на пациентите (n=53) със сигнификантна фиброза ($\geq F2$) и несигнификантна фиброза $< F2$, определена от хистологичното изследване

Таблица 12: Разпределение на средните стойности на неинвазивните маркери на фиброза при пациентите с проведена биопсия (n=53), разделени в 2 групи – с несигнификантна фиброза ($< F2$) и със сигнификантна фиброза ($\geq F2$)

Биопсия Групи 2	Показател	N	Mean	Median	SD	Min	Max
$< F2$	Shear-wave	23	5,52	5,10	1,06	4,00	8,36
	APRI	23	0,44	0,36	0,37	0,15	1,81
	FIB-4	23	0,17	0,15	0,14	0,01	0,73
	ACAT/АЛТ	23	0,76	0,65	0,37	0,28	1,92
	FibroTest	22	0,17	0,16	0,11	0,03	0,54
	ActiTest	22	0,44	0,39	0,26	0,06	0,98
$\geq F2$	Shear-wave	29	13,62	10,68	8,56	4,44	37,30
	APRI	29	3,20	1,10	7,23	0,12	38,78
	FIB-4	29	0,52	0,28	0,54	0,00	2,00
	ACAT/АЛТ	29	0,90	0,79	0,40	0,43	1,85
	FibroTest	27	0,53	0,56	0,35	0,06	0,99
	ActiTest	27	0,65	0,74	0,30	0,05	1,00

Таблица 13: Способност на неинвазивните методи да разграничават сигнификантна ($\geq F2$) от несигнификантна фиброза ($< F2$). Mann-Whitney test

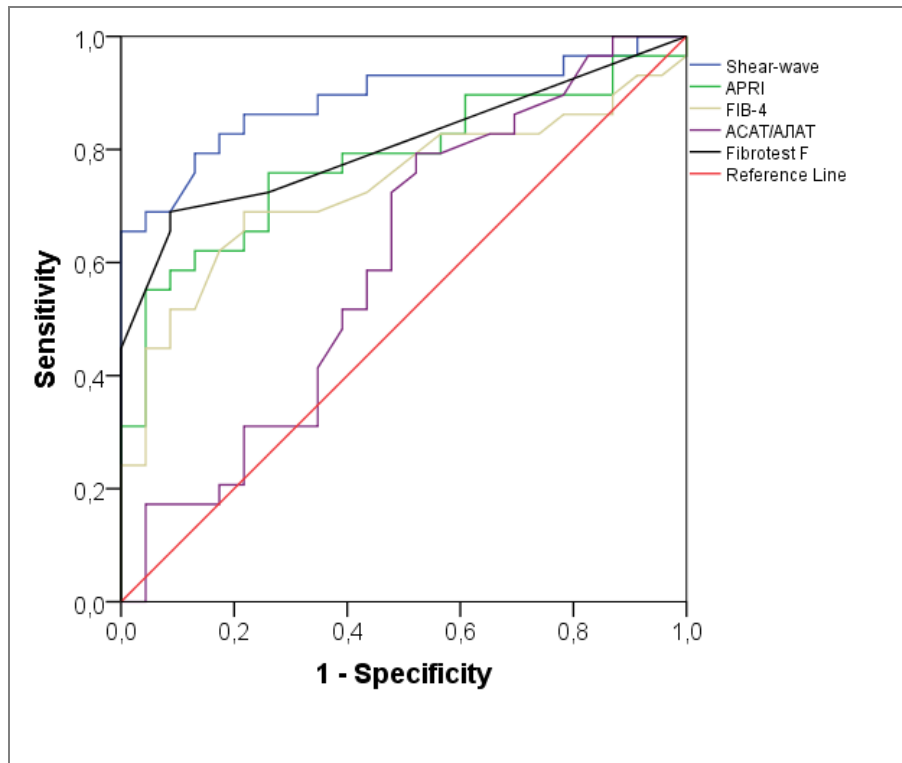
	$<F2$	$<F2$	$\geq F2$
	$\geq F2$	Контроли	Контроли
	p	p	p
Shear-wave	<0,001	0,003	<0,001
APRI	0,001	0,002	<0,001
FIB-4	0,004	0,100	0,186
АСАТ/АЛАТ	0,210	<0,001	<0,001
FibroTest	<0,001	0.951	0.007
ActiTest	0.015	<0,001	<0,001

Таблица 14: ROC анализ по отношение на групите $<F2$ и $\geq F2$

Показател	AUC	SE	p	95% CI	
Shear-wave	0,888	0,047	<0,001	0,795	0,980
APRI	0,778	0,065	0,001	0,651	0,906
FIB-4	0,735	0,071	0,004	0,596	0,873
АСАТ/АЛАТ	0,602	0,082	0,210	0,442	0,762
Fibrotest	0,808	0,061	<0,001	0,688	0,928

Таблица 15: Cut-off стойности за наличие на сигнификантна фиброза ($\geq F2$)

Показател	Cut-off	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV
Shear-wave	6,16	0,828	0,826	0,924	0,653
APRI	0,45	0,759	0,739	0,886	0,534
FIB-4	0,21	0,690	0,783	0,865	0,557
АСАТ/АЛАТ	0,72	0,586	0,565	0,776	0,347
Fibrotest	F2	0,724	0,739	0,872	0,523



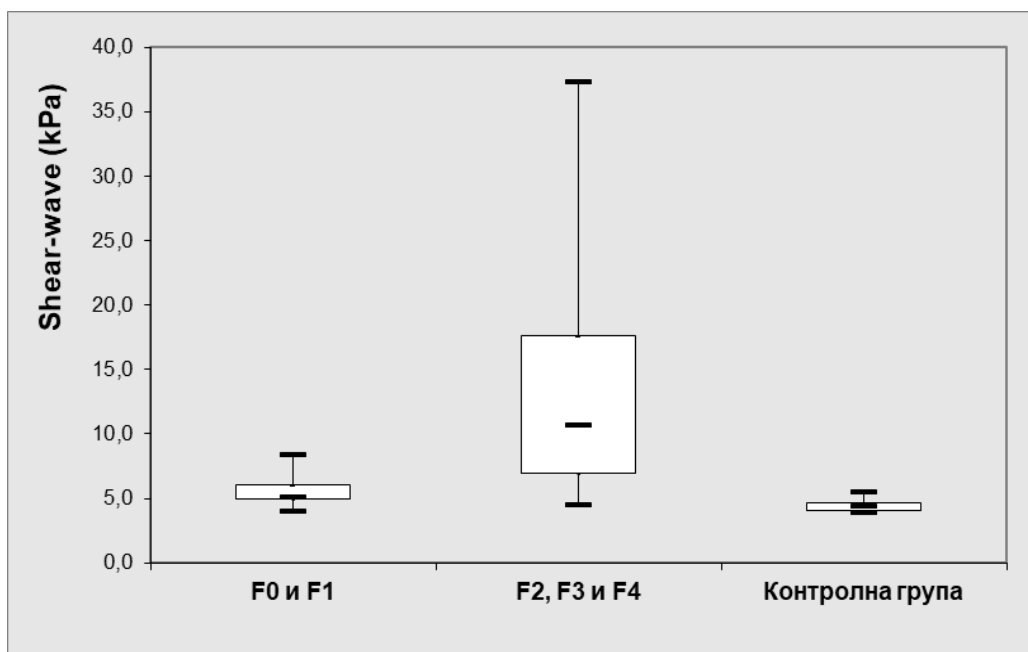
Фигура 10: ROC анализ по отношение на групите $<F2$ и $\geq F2$

Таблица 16: Разпределение на пациентите с несигнификантна ($<F2$), сигнификантна ($\geq F2$) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa

Фиброза	N	Mean	Median	SD	Min	Max
F0 и F1	24	5,50	5,10	1,04	4,00	8,36
F2, F3 и F4	29	13,62	10,68	8,56	4,44	37,30
Контроли	10	4,43	4,37	0,46	3,88	5,44

Таблица 17: Разпределение на пациентите с несигнификантна (<F2), сигнификантна (≥F2) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa. Mann-Whitney test

	Контроли	Контроли	F0 и F1
	F0 и F1	F2, F3 и F4	F2, F3 и F4
	ρ	ρ	ρ
Shear-wave	0,002	<0,001	<0,001



Фигура 11: Разпределение на пациентите с несигнификантна (<F2), сигнификантна (≥F2) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa. Горната и долната граница на бокс плотовете са първият и съответно вторият кватил. Дължината на кутиите представят интеркватилния обхват (IQR), в който се намират 50% от стойностите. Линията през средата на всяка кутия показва медианата. Крайните линии на кутиите демонстрират измерените минимални и максимални стойности на чернодробната плътност.

Неинвазивните методи за оценка на фиброзата имат най-добра AUC със специфичност и сензитивност да разграничават напреднала фиброза (≥F3) от липса на фиброза (F0), демонстрирано на таблици 14, 15 и фигура 12. Най-голяма площ под кривата има Shear wave еластографията 1,00 (SE 0,000, p<0,001, 95% CI 1,000-1,000), последвана от FibroTest AUC 0,948 (SE 0,46, p<0,001, 95% CI 0,857-1,000), APRI AUC 0,879 (SE 0,078, p=0,001, 95% CI 0,726-1,000) и FIB-4 AUC 0,761 (SE 0,097, p=0,026, 95% CI 0,570-0,951).

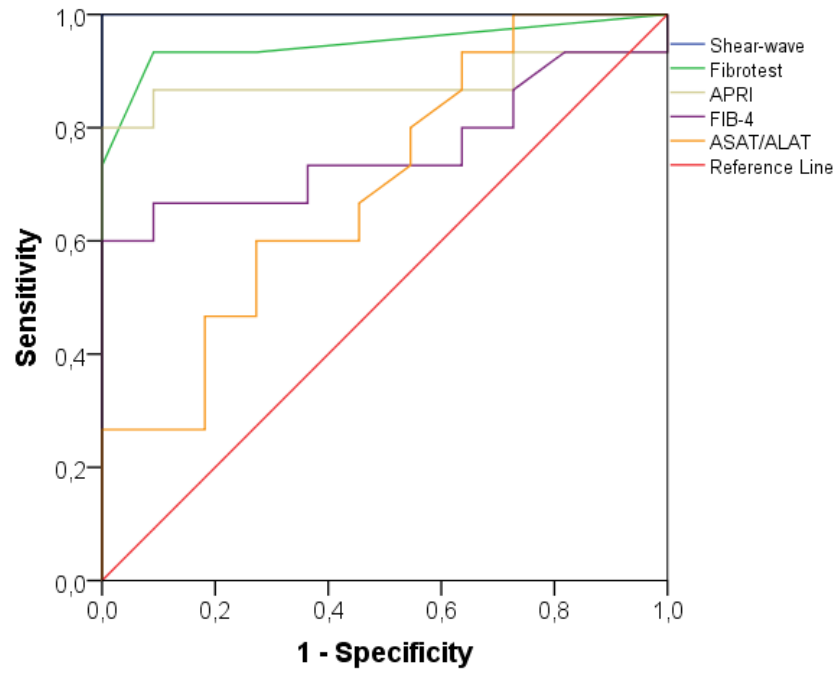
Отношението АСАТ/АЛАТ не може да разграничи и напреднала фиброза ($\geq F3$) ($p=0,092$). Cut-off $\geq 7,12$ kPa открива напреднала фиброза ($\geq F3$) с чувствителност 100% и специфичност 100%. Cut-off стойностите, над които има напреднала фиброза за APRI и FIB-4, са 0,70 (чувствителност 86,7%, специфичност 90,9%) и 0,15 (чувствителност 73,3%, специфичност 63,6%). Cut-off стойностите за разграничаване на сигнификантна ($\geq F2$) от напреднала фиброза ($\geq F3$) от FIB-4 се припокриват 0,21 и 0,15.

Таблица 18: ROC анализ по отношение на групите F0 и $\geq F3$

Показател	AUC	SE	p	95% CI	
Shear-wave	1,000	0,000	<0,001	1,000	1,000
Fibrotest	0,948	0,046	<0,001	0,857	1,000
APRI	0,879	0,078	0,001	0,726	1,000
FIB-4	0,761	0,097	0,026	0,570	0,951
ASAT/ALAT	0,697	0,105	0,092	0,491	0,903

Таблица 19: Cut-off стойности за наличие на напреднала фиброза ($\geq F3$)

Показател	Cut-off	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV
Shear-wave	7,12	1,000	1,000	1,000	1,000
Fibrotest	F0	0,933	0,909	0,909	0,933
APRI	0,70	0,867	0,909	0,834	0,929
FIB-4	0,15	0,733	0,636	0,636	0,733
ASAT/ALAT	0,82	0,600	0,727	0,571	0,750



Фигура 12: ROC анализ по отношение на групите F0 и \geq F3

Задача 4

В таблица 20 са показани съответните прагови стойности от еластографията, над които има лека ($\geq F1$), сигнификантна ($\geq F2$) и напреднала фиброза ($\geq F3$) със съответните чувствителност и специфичност, негативна и позитивна предиктивна стойност.

Таблица 20: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от Shear-wave еластографията

Степен на фиброза	Cut-off (kPa)	AUC	Sensitivity	Specificity	NNP	PPV
$\geq F1$	5,86	0,773	0,762	0,727	0,444	0,914
$\geq F2$	6,16	0,888	0,828	0,826	0,924	0,653
$\geq F3$	7,12	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

В таблица 21 са показани съответните прагови стойности на APRI, над които има лека ($\geq F1$), сигнификантна ($\geq F2$) и напреднала фиброза ($\geq F3$) със съответните чувствителност и специфичност, негативна и позитивна предиктивна стойност.

Таблица 21: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от APRI

Степен на фиброза	Cut-off	AUC	Sensitivity	Specificity	NNP	PPV
$\geq F1$	0,40	0,712	0,619	0,636	0,304	0,867
$\geq F2$	0,45	0,778	0,759	0,739	0,886	0,534
$\geq F3$	0,70	0,879	0,867	0,909	0,854	0,929

В таблица 22 са показани съответните прагови стойности на FIB-4, над които има лека ($\geq F1$), сигнификантна ($\geq F2$) и напреднала фиброза ($\geq F3$) със съответните чувствителност и специфичност, негативна и позитивна предиктивна стойност.

Таблица 22: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от FIB-4

Степен на фиброза	Cut-off	AUC	Sensitivity	Specificity	NNP	PPV
$\geq F1$	0,15	0,736	0,762	0,636	0,412	0,889
$\geq F2$	0,21	0,735	0,690	0,783	0,865	0,557
$\geq F3$	0,15	0,761	0,733	0,636	0,636	0,733

В таблица 23 са показани използваните прагови стойности на FibroTest, над които има лека ($\geq F1$), сигнификантна ($\geq F2$) и напреднала фиброза ($\geq F3$) със съответните чувствителност и специфичност, негативна и позитивна предиктивна стойност.

Таблица 23: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от FibroTest

Степен на фиброза	Cut-off	AUC	Sensitivity	Specificity	NNP	PPV
$\geq F1$	F0	0,709	0,571	0,727	0,307	0,889
$\geq F2$	F2	0,808	0,724	0,739	0,872	0,523
$\geq F3$	F0	0,948	0,933	0,909	0,909	0,933

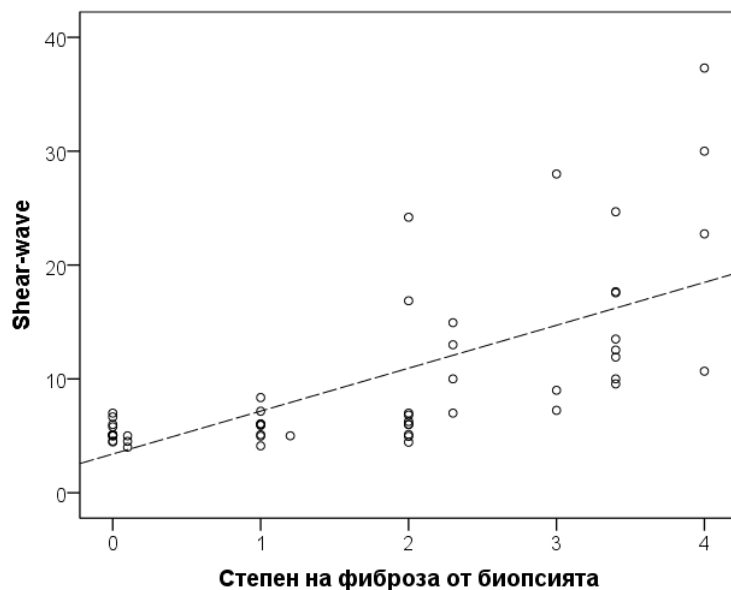
Задача 5

Чрез Spearman's rho test потърсихме корелационната зависимост между резултатите от чернодробната биопсия, еластографията и неинвазивните биомаркери. Резултатите са представени в таблица 24.

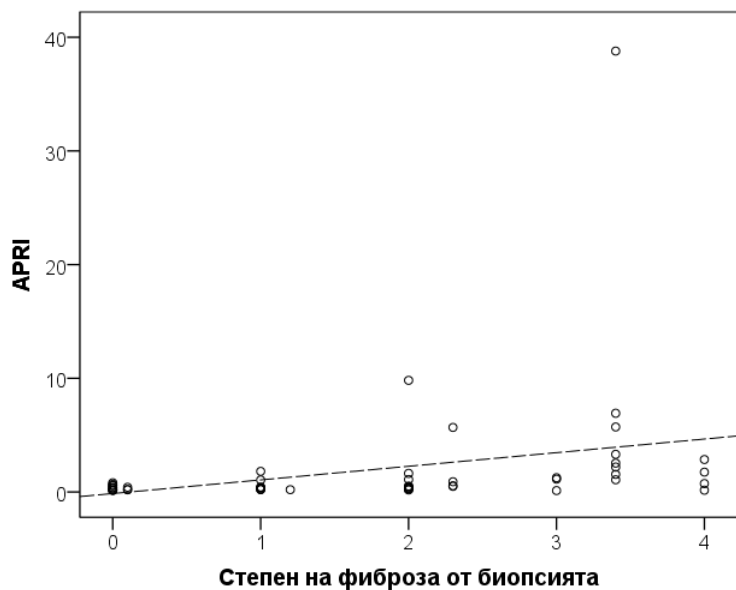
Таблица 24: Корелационна зависимост между неинвазивните показатели и степента на хистологична фиброза

Степен на фиброза от биопсията ↔	Shear-wave	APRI	FIB-4	АСАТ/АЛАТ	FibroTest-ActiTest
R	0,736	0,510	0,365	0,222	0,668
p	<0,001	<0,001	0,007	0,109	<0,001
N	53	53	53	53	53

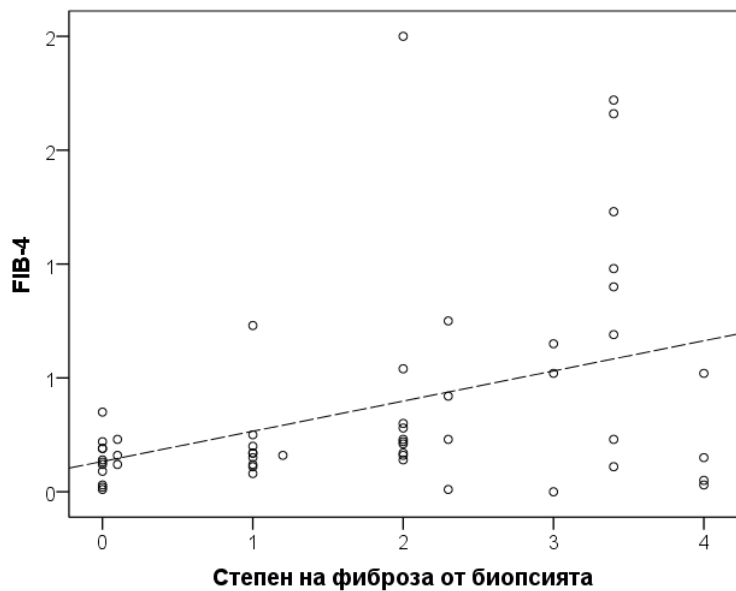
Най-силно с фиброзата, определена хистологично, корелира Shear-wave еластографията 0,736 (фиг. 13). Значително корелират с нея резултатите от FibroTest-ActiTest ($r=0,668$) (фиг. 16) и APRI ($r=0,510$) (фиг. 14). FIB-4 корелира умерено ($r=0,365$) (фиг. 15), а съотношението АСАТ/АЛАТ не корелира с фиброзата ($p=0,109$).



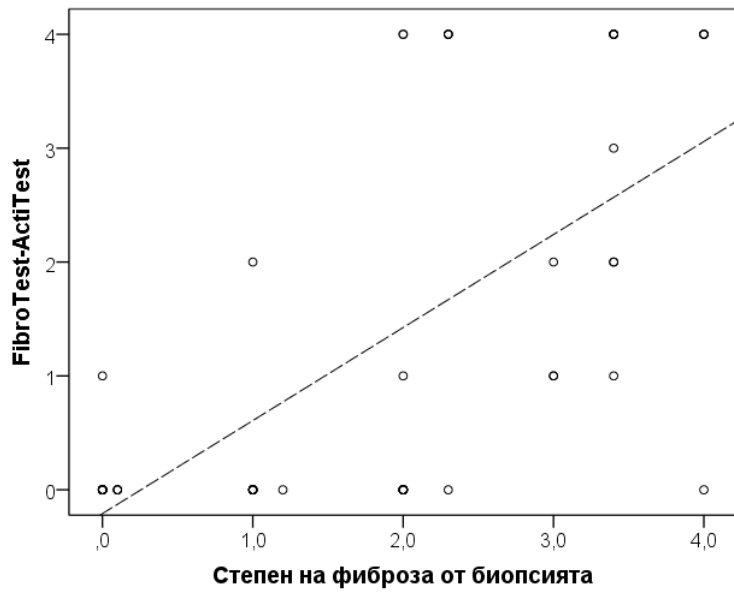
Фигура 13: Корелация между еластографията и фиброзата, определена хистологично



Фигура 14: Корелация между APRI и фиброзата, определена хистологично



Фигура 15: Корелация между FIB-4 и фиброзата, определена хистологично

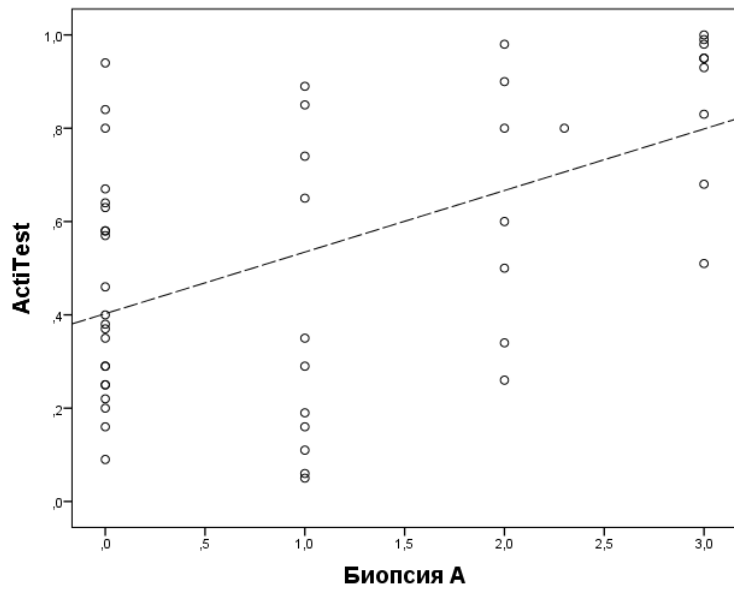


Фигура 16: Корелация между FibroTest и фиброзата, определена хистологично

Таблица 25: Корелация между ActiTest и активност от хистологичното изследване

		ActiTest
Биопсия Активност	R	0,470
	p	0,001
	N	50

Активността от FibroTest-ActiTest корелира умерено ($r=0,470$, $p=0,001$) с активността, определена хистологично (табл. 25).



Фигура 17: Корелация между ActiTest и активност от хистологичното изследване

Задача 6

Проучи се зависимостта между стойностите на еластографията при биопсираните пациенти и пола, възрастта, ИТМ, стойностите на АСАТ, АЛАТ, общия и директния билирубин. Чернодробната плътност не зависи от пола ($8,62 \pm 5,61$ vs. $11,54 \pm 9,20$, $p=0,339$) (табл. 26). Пациентите се разпределиха в 3 възрастови групи – 0-5 години; 6-10 години и 11-17 години. Не се откри статистически значима разлика на стойностите от еластографията в различните групи ($p=0,374$) (табл. 27).

Таблица 26: Зависимост на еластографията от пола. Mann-Whitney test

Група	Пол	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
С биопсия	Момчета	29	8,62	6,06	5,61	4,00	30,00	0,339
	Момичета	24	11,54	6,91	9,20	4,12	37,30	

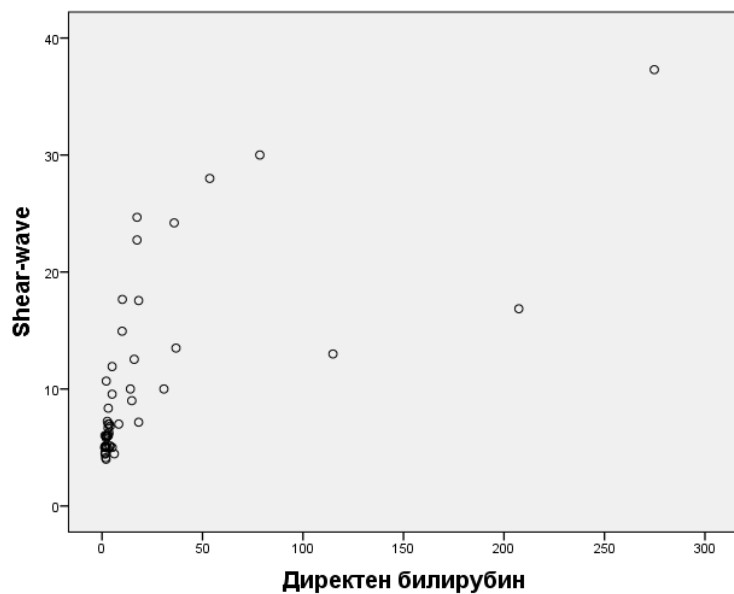
Таблица 27: Зависимост на еластографията от възрастта. Kruskal-Wallis test

Група	Възрастова група	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
С биопсия	0-5 г	15	12,30	7,16	10,11	5,08	37,30	0,374
	6-10 г	15	9,14	6,00	6,35	4,00	24,68	
	11-17 г	23	8,93	6,06	6,13	4,44	28,00	

Не се установи зависимост между стойностите на чернодробната плътност и ИТМ ($p=0,197$). Установи се силна връзка между еластографията и стойностите на директния ($r=0,800$, $p<0.001$) (фиг. 17) и общия билирубин ($r=0,738$, $p<0.001$) и умерена връзка при АСАТ ($r=0,641$, $p<0.001$) и АЛАТ ($r=0,518$, $p<0.001$) (табл. 28).

Таблица 28: Корелационна зависимост между чернодробната плътност и ИТМ, АСАТ, АЛАТ, общ и директен билирубин. Spearman's rho Correlations

Shear-wave	ИТМ	АСАТ	АЛАТ	Общ билирубин	Директен билирубин
R	-0,180	0,641	0,518	0,738	0,800
p	0,197	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
N	53	53	53	53	53



Фигура 17: Зависимост между директния билирубин и еластографията

Задача 7

При 22 деца с НАМЧБ (15 момчета и 7 момичета) и 10 здрави контроли (5 момчета и 5 момичета) се изследваха демографските, хистологичните, лабораторните показатели, показани в таблици 29 и 31. Средната възраст на пациентите с НАМЧБ е $10,39 \pm 3$ години, а на контролите $10,90 \pm 5,22$ години.

Таблица 29: Разпределение по пол на пациентите с НАМЧБ и контролите

Пол		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
Момчета	N	15	5	20	0,438
	%	68,2%	50,0%	62,5%	
Момичета	N	7	5	12	
	%	31,8%	50,0%	37,5%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Двадесет от пациентите (90,95%) са с високостепенно затлъстяване - ИТМ за възрастта над 99 перцентил, едно е със затлъстяване ВМІ за възрастта над 95 перцентил и едно от децата е с наднормено тегло ВМІ за възрастта над 95 перцентил (табл. 30).

Таблица 30: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите по тегло спрямо перцентили за ВМІ

ВМІ ре		НАМЧБ	Контроли	Общо
Норма	N	0	10	10
	%	0,0%	100,0%	31,3%
Наднормено тегло	N	1	0	1
	%	4,5%	0,0%	3,1%
Затлъстяване	N	1	0	1
	%	4,5%	0,0%	3,1%
Високостепенно затл.	N	20	0	20
	%	90,9%	0,0%	62,5%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Таблица 31: Лабораторни, демографски и антропометрични показатели на пациентите с НАМЧБ и контролите

Показател	Диагноза	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
Възраст	НАМЧБ	22	10,36	10,00	3,06	4,00	17,00	0,581
	Контроли	10	10,90	12,00	5,22	2,00	17,00	
SDS	НАМЧБ	22	0,37	0,32	0,22	0,11	0,74	0,583
	Контроли	10	0,40	0,36	0,14	0,22	0,72	
FIB-4	НАМЧБ	22	0,17	0,17	0,05	0,09	0,23	0,107
	Контроли	10	0,24	0,23	0,14	0,03	0,51	
APRI	НАМЧБ	22	0,27	0,22	0,13	0,11	0,55	0,049
	Контроли	10	0,18	0,15	0,08	0,10	0,34	
Тромбоцити	НАМЧБ	22	301,77	289,50	41,83	228,00	371,00	0,309
	Контроли	10	284,00	262,00	105,24	133,00	466,00	
АСАТ	НАМЧБ	22	30,86	26,50	15,28	14,00	65,00	0,015
	Контроли	10	18,50	18,50	3,72	14,00	26,00	
АЛАТ	НАМЧБ	22	42,23	30,50	29,66	11,00	105,00	<0,001
	Контроли	10	11,50	10,50	3,14	7,00	17,00	
ГГТ	НАМЧБ	22	24,95	20,00	20,05	5,00	82,00	0,021
	Контроли	10	11,50	10,00	5,21	7,00	25,00	
Алкална фосфатаза	НАМЧБ	22	237,50	239,50	82,04	80,00	443,00	0,014
	Контроли	10	160,60	166,00	66,74	71,00	243,00	
Холестерол	НАМЧБ	22	4,17	4,09	0,88	2,38	5,83	0,100
	Контроли	10	3,66	3,72	0,53	2,56	4,23	
HDL-холестерол	НАМЧБ	22	1,24	1,16	0,49	0,74	3,10	0,569
	Контроли	10	1,17	1,23	0,54	0,00	1,92	
LDL-холестерол	НАМЧБ	22	2,31	2,52	0,76	0,99	3,62	0,117
	Контроли	9	1,93	1,92	0,43	1,15	2,57	
Триглицериди	НАМЧБ	22	1,39	1,25	0,82	0,50	3,80	0,045
	Контроли	10	0,89	0,90	0,30	0,40	1,50	
Пикочна киселина	НАМЧБ	22	340,05	338,50	84,89	211,00	552,00	0,009
	Контроли	10	254,40	220,00	77,00	169,00	441,00	
ИТМ	НАМЧБ	22	28,45	28,50	3,73	19,00	36,00	<0,001
	Контроли	10	19,20	18,00	4,05	14,00	25,00	
Тегло	НАМЧБ	22	63,59	62,00	17,92	26,00	102,00	0,020
	Контроли	10	43,80	45,50	21,09	12,00	74,00	
Ръст	НАМЧБ	22	148,00	148,00	17,15	116,00	178,00	0,597
	Контроли	10	147,30	157,50	30,11	88,00	187,00	
Ръст ре	НАМЧБ	21	73,80	80,60	27,62	2,20	99,80	0,375
	Контроли	10	66,07	80,70	30,09	13,50	95,30	
Ръст Z	НАМЧБ	21	0,96	0,86	1,24	-2,01	3,49	0,375

	Контроли	10	0,53	0,87	0,95	-1,10	1,67	
ИТМ Z	НАМЧБ	22	3,26	3,29	0,89	1,34	5,44	<0,001
	Контроли	10	0,15	0,29	0,73	-1,24	1,09	
Коремна обиколка	НАМЧБ	12	94,75	93,00	9,70	84,00	115,00	0,004
	Контроли	4	65,00	65,00	11,11	54,00	76,00	
Остеокалцин	НАМЧБ	22	19,09	19,55	17,63	0,00	67,10	0,079
	Контроли	10	33,48	29,15	21,50	10,80	80,70	
RR_S	НАМЧБ	22	120,09	120,00	10,28	100,00	141,00	0,003
	Контроли	10	101,20	107,50	17,06	79,00	126,00	
RR_D	НАМЧБ	22	71,68	70,50	10,65	52,00	100,00	0,017
	Контроли	10	62,80	60,00	5,69	54,00	72,00	
Глюкоза	НАМЧБ	22	4,94	5,08	0,92	2,00	6,30	0,542
	Контроли	10	4,86	4,83	0,33	4,37	5,54	

При децата с НАМЧБ във връзка със заболяването са установени по-високи средни стойности на чернодробните ензими АСАТ ($30,86 \pm 15,38$ vs. $18,50 \pm 3,72$, $p=0,015$); АЛАТ ($42,23 \pm 29,66$ vs. $11,50 \pm 3,14$, $p<0,001$); ГГТ ($24,95 \pm 20,05$ vs. $11,50 \pm 5,21$, $p=0,021$) и АФ ($237,50 \pm 82,04$ vs. $160,60 \pm 66,74$, $p=0,014$) в сравнение с тези при здравите контроли. В рамките на метаболитния синдром стойностите на пикочната киселина са също значимо по-високи ($340,05 \pm 84,89$ vs. $254,40 \pm 77,00$, $p=0,009$), както и теглото ($63,59 \pm 17,92$ vs. $43,80 \pm 21,09$, $p=0,020$), ИТМ ($28,45 \pm 3,73$ vs. $19,20 \pm 4,05$, $p<0,001$), z-score за ИТМ ($3,26 \pm 0,89$ vs. $0,15 \pm 0,73$, $p<0,001$) и коремната обиколка ($94,75 \pm 9,70$ vs. $65,00 \pm 11,11$, $p=0,004$). От липидните показатели единствено стойностите на ТГ са значимо по-високи ($1,39 \pm 0,82$ vs. $0,89 \pm 0,30$, $p=0,045$). Стойностите на кръвната захар и в двете групи са нормални и няма статистическа разлика ($4,94 \pm 0,92$ vs. $4,86 \pm 0,33$, $p=0,542$) (табл. 31). Четирима пациенти (18,2%) имат нарушена гликемия на гладно, останалите имат нормални стойности на кръвната захар на гладно (табл. 32).

Таблица 32: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите спрямо стойностите на кръвната захар

Glu		НАМЧБ	Контроли	Общо
Норма	N	18	10	28
	%	81,8%	100,0%	87,5%
Нарушена гликемия на гладно	N	4	0	4
	%	18,2%	0,0%	12,5%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Инсулинова резистентност, дефинирана като HOMA Index > 2,5, имат 90,9% от пациентите с НАМЧБ (табл. 33).

Таблица 33: Разпределение на пациентите с НАМЧБ спрямо наличието на инсулинова резистентност, дефинирана като HOMA Index > 2,5

HOMA		НАМЧБ
<2,5	N	2
	%	9,1%
> 2,5 Инсулинова резистентност	N	20
	%	90,9%
Общо	N	22
	%	100,0%

Както средните систолни стойности на артериалното кръвно налягане ($120,09 \pm 10,28$ vs. $101,20 \pm 17,06$, $p=0,003$), така и диастолните са значимо по-високи при пациентите с НАМЧБ ($71,68 \pm 10,65$ vs. $62,80 \pm 5,69$, $p= 0,017$) (табл. 34). Половината от пациентите (54,5%) имат нормални стойности на кръвното налягане, от останалите - 22,7% (5/22) имат прехипертония и 22,7% (5/22) имат хипертония (табл. 34).

Таблица 34: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите спрямо стойностите на кръвното налягане

АХ		НАМЧБ	Контроли	Общо
Нормално кръвно налягане	N	12	10	22
	%	54,5%	100,0%	68,8%
Прехипертония	N	5	0	5
	%	22,7%	0,0%	15,6%
Хипертония	N	5	0	5
	%	22,7%	0,0%	15,6%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Шестнадесет от децата (72,7%) имат увеличени стойности на АСАТ (табл. 35), 9 (40,9%) -АЛАТ (табл), 4 (18,2%) АФ (табл. 36).

Таблица 35: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АСАТ

АСАТ		НАМЧБ	Контроли	Общо
Норма	N	16	10	26
	%	72,7%	100,0%	81,3%
Над норма	N	6	0	6
	%	27,3%	0,0%	18,8%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Таблица 36: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АЛАТ

АЛАТ		НАМЧБ	Контроли	Общо
Норма	N	9	10	19
	%	40,9%	100,0%	59,4%
Над норма	N	13	0	13
	%	59,1%	0,0%	40,6%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Таблица 37: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АФ

Алкална фосфатаза		НАМЧБ	Контроли	Общо
Норма	N	18	10	28
	%	81,8%	100,0%	87,5%
Над норма	N	4	0	4
	%	18,2%	0,0%	12,5%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Девет от децата с НАМЧБ (59,1%) имат повишени стойности на общия холестерол (табл. 38). Половината (12/22) имат нисък HDL-холестерол и едно дете има по-висок HDL-холестерол (табл. 39).

Таблица 38: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на холестерол

Холестерол		НАМЧБ	Контроли	Общо
Норма	N	13	10	23
	%	59,1%	100,0%	71,9%
Над норма	N	9	0	9
	%	40,9%	0,0%	28,1%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Таблица 39: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на HDL-холестерол. Fisher's Exact Test

HDL-холестерол		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
Норма	N	10	6	16	0,704
	%	45,5%	60,0%	50,0%	
Под норма	N	12	4	16	
	%	54,5%	40,0%	50,0%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 40: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на LDL-холестерол

LDL-холестерол		НАМЧБ	Контроли	Общо
Норма	N	21	9	30
	%	95,5%	100,0%	96,8%
Над норма	N	1	0	1
	%	4,5%	0,0%	3,2%
Общо	N	22	9	31
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Най-висок е процентът (45,5%) на хипертриглицеридемията (табл. 41).

Таблица 41: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на ТГ. Fisher's Exact Test

Триглицериди		НАМЧБ	Контроли	Общо	р
Норма	N	12	9	21	0,106
	%	54,5%	90,0%	65,6%	
Над норма	N	10	1	11	
	%	45,5%	10,0%	34,4%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Ехографското изследване установи хепатомегалия при 81,8% от пациентите с НАМЧБ (табл. 42).

Таблица 42: Разпределение на пациентите и контролите с верифицирана ехографски хепатомегалия

Хеп.-US		НАМЧБ	Контроли	Общо
Няма хепатомегалия ехографски	N	4	10	14
	%	18,2%	100,0%	43,8%
Има хепатомегалия ехографски	N	18	0	18
	%	81,8%	0,0%	56,3%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Чернодробната плътност при пациентите с НАМЧБ е статистически значимо по-висока спрямо тази при здравите контроли ($5,38 \pm 0,87$ vs $4,43 \pm 0,46$, $p=0,003$) (табл. 43, 44).

Таблица 43: Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ, ХЧЗ и контроли

Показател	Диагноза	N	Mean	Median	SD	Min	Max
Shear-wave	НАМЧБ	23	5,38	5,00	0,87	4,00	7,00
	Други ХЧЗ	42	11,07	7,20	8,08	4,12	37,30
	Контрола	10	4,43	4,37	0,46	3,88	5,44

Таблица 44: Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ, ХЧЗ и контроли. Mann-Whitney test

	НАМЧБ	НАМЧБ	Други ХЧЗ
	Други ХЧЗ	Контрола	Контрола
	p	p	p
Shear-wave	<0,001	0,003	<0,001

Таблица 45: Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ и контроли. Mann-Whitney Test

Диагноза	Възрастова група	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
НАМЧБ	2-10	13	5,43	5,00	1,00	4,00	7,00	0,914
	11-17	9	5,39	5,00	0,78	4,52	7,00	
Контроли	2-10	4	4,25	4,00	0,50	4,00	5,00	n/a
	11-17	6	4,67	5,00	0,52	4,00	5,00	

Резултатите от FibroTestActiTest са представени в табл. 46 и 47. При 20 от пациентите (90,9%) FibroTest не открива фиброза (F0), а при 2 намира лека фиброза (F1). При 13 от пациентите (59,1%) методът не открива активен хепатит (A0), при 5 умерен хепатит (A2) и при 1 тежък хепатит (A3) (табл. 47). При 7 от контролите (70,0%) FibroTest не открива фиброза (F0), при 2 намира лека фиброза (F1) и при 1 значима фиброза (F2). FibroTest не открива значима разлика в степените на фиброза при пациентите с НАМЧБ и здравите контроли ($p=0,234$).

Вероятно това се дължи на ниската диагностична стойност на теста при несигнификантна фиброза ($<F2$).

Таблица 46: Разпределение степента на фиброза от FibroTest при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

FibroTest		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
0	N	20	7	27	
	%	90,9%	70,0%	84,4%	
0(1)	N	2	2	4	
	%	9,1%	20,0%	12,5%	
1(2)	N	0	1	1	
	%	0,0%	10,0%	3,1%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 47: Разпределение степента на активност на хепатит от ActiTest при пациентите с НАМЧБ и контролите

ActiTest		НАМЧБ	Контроли	Общо
0	N	13	10	23
	%	59,1%	100,0%	71,9%
0(1)	N	1	0	1
	%	4,5%	0,0%	3,1%
2	N	2	0	2
	%	9,1%	0,0%	6,3%
3	N	1	0	1
	%	4,5%	0,0%	3,1%
1(2)	N	5	0	5
	%	22,7%	0,0%	15,6%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

По етични съображения чернодробна биопсия при контролите не е извършвана. При 12 от пациентите (54,5%) е направена биопсия (табл. 48).

Таблица 48: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите, при които е извършена чернодробна биопсия

Биопсия_0_1		НАМЧБ	Контроли	Общо
Не	N	12	10	22
	%	54,5%	100,0%	68,8%
Да	N	10	0	10
	%	45,5%	0,0%	31,3%
Общо	N	22	10	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Значима фиброза ($\geq F2$) от биопсията се открива при 2 от децата (табл. 49).

Останалите 80,8% (8/10) имат незначима фиброза ($<F2$), от които 2 имат лека фиброза (F1) и 6 нямат фиброза (F0).

Таблица 49: Разпределение на степента на фиброза от хистологичното изследване при пациентите с НАМЧБ

Биопсия Групи		НАМЧБ
$<F2$	N	8
	%	80,0%
$\geq F2$	N	2
	%	20,0%
Общо	N	10
	%	100,0%

Изследва се разпространението на *PNPLA3* I148M, *TM6SF2* E167K и *GCKR* P446L полиморфизми при 22 пациенти с НАМЧБ и 10 здрави контроли (табл. 50, 52, 54).

Най-често срещаният генетичен полиморфизъм в изследваната популация (пациенти и контроли) е *GCKR* P446L (табл. 51). Наблюдава се при 7 пациенти в хетерозиготно състояние и при 12 в хомозиготно. Среща се и при половината от

контролите – при 4 в хетерозиготно и при 1 в хомозиготно състояние. Наличието на *GCKR* P446L в хомозиготно състояние се асоциира с развитие на НАМЧБ при пациенти с метаболитен синдром ($p=0,025$) (табл. 50).

Таблица 50: Разпределение на наличието *GCKR* P446L в хомо-и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

GCKR		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
0	N	3	5	8	0,025
	%	13,6%	50,0%	25,0%	
Хетерозигот	N	7	4	11	
	%	31,8%	40,0%	34,4%	
Хомозигот	N	12	1	13	
	%	54,5%	10,0%	40,6%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 51: Разпределение на наличието *GCKR* P446L алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

GCKR Group		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
Няма патологичен алел	N	3	5	8	0,072
	%	13,6%	50,0%	25,0%	
Има патологичен алел	N	19	5	24	
	%	86,4%	50,0%	75,0%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Вторият най-често срещан полиморфизъм е *PNPLA3* I148M. Наблюдава се при 40,9% от пациентите, при 7 в хомозиготно и при 1 в хетерозиготно състояние. *PNPLA3* I148M се среща при 7 от контролите, при 6 от тях в хомозиготно и при 1 в хетерозиготно състояние. Наличието на *PNPLA3* I148M не се асоциира с развитие на НАМЧБ ($p=0,246$) (табл. 52).

Таблица 52: Разпределение на наличието *PNPLA3* P148M в хомо-и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

PNPLA3		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
Няма патологичен алел	N	13	3	16	0,246
	%	59,1%	30,0%	50,0%	
Хетерозигот	N	2	1	3	
	%	9,1%	10,0%	9,4%	
Хомозигот	N	7	6	13	
	%	31,8%	60,0%	40,6%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 53: Разпределение на наличието *PNPLA3* P148M алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

PNPLA3 Group		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
Няма патологичен алел	N	13	3	16	0,252
	%	59,1%	30,0%	50,0%	
Има патологичен алел	N	9	7	16	
	%	40,9%	70,0%	50,0%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Най-рядко срещаният полиморфизъм е *TM6SF2* E167K. Намира се при 1 пациент с хомозиготно и при 1 в хетерозиготно състояние. Само 1 от контролите е хетерозиготен носител на полиморфизма. Наличието на *TM6SF2* E167K не се асоциира с развитие на НАМЧБ ($p=1,000$) (табл. 55, 56).

Таблица 54: Разпределение на наличието *TM6SF2* E167K в хомо-и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

TM6SF2		НАМЧБ	Контроли	Общо	р
0	N	20	9	29	1,000
	%	90,9%	90,0%	90,6%	
Хетерозигот	N	1	1	2	
	%	4,5%	10,0%	6,3%	
Хомозигот	N	1	0	1	
	%	4,5%	0,0%	3,1%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 55: Разпределение на наличието *TM6SF2* E167K алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

TM6SF2		НАМЧБ	Контроли	Общо	р
Няма патологичен алел	N	20	9	29	1,000
	%	90,9%	90,0%	90,6%	
Има патологичен алел	N	2	1	3	
	%	9,1%	10,0%	9,4%	
Общо	N	22	10	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Разпределение на патологичните алели при съответните гени е показано на таблица 56.

Таблица 56: Разпределение на наличието на патологичен алел на *GCKR* P446L, *PNPLA3* I148M и *TM6SF2* E167K при пациентите с НАМЧБ и контролите

Гени	Диагноза	Патологичен алел	N	%
GCKR	НАМЧБ	Няма патологичен алел	3	13,6
		Има патологичен алел	19	86,4
	Контроли	Няма патологичен алел	5	50,0
		Има патологичен алел	5	50,0
PNPLA3	НАМЧБ	Няма патологичен алел	13	59,1
		Има патологичен алел	9	40,9
	Контроли	Няма патологичен алел	3	30,0
		Има патологичен алел	7	70,0
TM6SF2	НАМЧБ	Няма патологичен алел	20	90,9
		Има патологичен алел	2	9,1
	Контроли	Няма патологичен алел	9	90,0
		Има патологичен алел	1	10,0

Поради малкия брой на участниците и неправилно разпределение на патологичните алели връзка между абнормни стойности на лабораторни показатели беше възможно да се потърси при пациентите с наличие на *PNPLA3* I148M в хомо- и хетерозиготно състояние.

Не се открива статистическа значима връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на АСАТ ($p=0,713$), АЛАТ ($p=0,947$), ГГТ ($p=0,841$), ТГ ($p=0,762$), холестерол ($p=0,867$), пикочна киселина ($p=0,713$), нарушена гликемия ($p=1,000$), инсулинова резистентност (НОМА index $>2,5$) ($p=0,494$) (табл. 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64).

Таблица 57: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на АСАТ. Mann-Whitney Test

Показател	PNPLA3 Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
АСАТ	Няма патологичен алел	13	30,46	23,00	16,37	14,00	65,00	0,713
	Има патологичен алел	9	31,44	30,00	14,49	16,00	56,00	

Таблица 58: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на АЛАТ. Mann-Whitney Test

Показател	PNPLA3 Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
АЛАТ	Няма патологичен алел	13	42,77	28,00	32,07	11,00	105,00	0,947
	Има патологичен алел	9	41,44	33,00	27,66	13,00	84,00	

Таблица 59: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на ГГТ. Mann-Whitney Test

Показател	PNPLA3 Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ГГТ	Няма патологичен алел	13	27,69	21,00	23,94	5,00	82,00	0,841
	Има патологичен алел	9	21,00	19,00	12,87	6,00	50,00	

Таблица 60: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на ТГ. Mann-Whitney Test

Показател	PNPLA3 Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
Триглицериди	Няма патологичен алел	13	1,28	1,30	0,70	0,50	3,10	0,762
	Има патологичен алел	9	1,54	1,20	1,00	0,70	3,80	

Таблица 61: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на холестерол. Mann-Whitney Test

Показател	PNPLA3 Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
Холестерол	Няма патологичен алел	13	4,20	4,10	0,86	2,78	5,83	0,867
	Има патологичен алел	9	4,11	4,08	0,96	2,38	5,75	

Таблица 62: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на пикочната киселина. Mann-Whitney Test

Показател	PNPLA3 Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
Пикочна киселина	Няма патологичен алел	13	338,62	349,00	68,24	211,00	438,00	0,713
	Има патологичен алел	9	342,11	285,00	109,20	214,00	552,00	

Таблица 63: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на кръвната захар. Fisher's Exact Test

Glu		PNPLA3 Group		Общо	p
		Няма патологичен алел	Има патологичен алел		
Норма	N	11	7	18	1,000
	%	84,6%	77,8%	81,8%	
Нарушена гликемия на гладно 5,6-6,9 ммол/л	N	2	2	4	
	%	15,4%	22,2%	18,2%	
Общо	N	13	9	22	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 64: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и инсулиновата резистентност. Fisher's Exact Test

НОМА		PNPLA3 Group		Общо	p
		Няма патологичен алел	Има патологичен алел		
<2,5	N	2	0	2	0,494
	%	15,4%	0,0%	9,1%	
> 2,5 Инсулинова резистентност	N	11	9	20	
	%	84,6%	100,0%	90,9%	
Общо	N	13	9	22	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Не се открива статистическа връзка между показателите на бъбречната функция, креатинин и eGFR ($p=0,214$; $p=0,096$), и наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M (табл. 65).

Таблица 65: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и бъбречната функция. Fisher's Exact Test

Показател	Група	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
Creatinine	НАМЧБ	22	46,82	44,00	12,42	26,00	76,00	0,214
	Контроли	10	55,50	55,00	22,33	24,00	107,00	
eGFR	НАМЧБ	22	164,65	161,50	24,19	127,70	228,10	0,096
	Контроли	10	147,25	142,55	24,28	102,40	186,80	

Не се открива статистическа значима връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и ИТМ ($p=0,788$) и наличието на хепатомегалия, установена ехографски ($p=1,000$) (табл. 66, 67).

Таблица 66: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и ИТМ. Mann-Whitney Test

Показател	PNPLA3 Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ИТМ	Няма патологичен алел	13	28,23	29,00	4,30	19,00	36,00	0,788
	Има патологичен алел	9	28,78	28,00	2,91	26,00	34,00	

Таблица 67: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и хепатомегалията, верифицирана ехографски. Fisher's Exact Test

Хеп.-US		PNPLA3 Group		Общо	p
		Няма патологичен алел	Има патологичен алел		
Няма хепатомегалия ехографски	N	2	2	4	1,000
	%	15,4%	22,2%	18,2%	
Има хепатомегалия ехографски	N	11	7	18	
	%	84,6%	77,8%	81,8%	
Общо	N	13	9	22	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

По литературни данни наличието на *GCKR* P446L полиморфизма се свързва с ниски стойности на кръвната захар на гладно. Само при 1 пациент (1/19) хомозигот по *GCKR* P446L е регистрирана ниска кръвна захар – 2 mmol/l.

На таблица 68 е показано разпределението на пациентите спрямо наличие на сигнификантна фиброза от хистологичното изследване. Има двама пациенти със сигнификантна фиброза (F2). Пациент № 1 е хомозигот по *PNPLA3* I148M и хетерозигот по *GCKR* P446L. Пациент № 2 е хетерозигот по *GCKR* P446L.

Таблица 68: Разпределение на фиброзата, оценена хистологично, при пациентите, носители на *PNPLA3* I148M алел

Биопсия Групи		PNPLA3 Group		Общо
		Няма патологичен алел	Има патологичен алел	
<F2	N	6	2	8
	%	85,7%	66,7%	80,0%
≥ F2	N	1	1	2
	%	14,3%	33,3%	20,0%
Общо	N	7	3	10
	%	100,0%	100,0%	100,0%

V. ОБСЪЖДАНЕ

1. Значение на 2D-SWE в детска възраст

През 2013 г. Европейската федерация на дружествата по ехография в медицината и биологията (EFSUMB) за първи път публикува клинични препоръки за употребата на ултразвуковата еластография (51). Те засягат основно транзиентната еластография, тъй като е първият достъпен метод. Две години по-късно Световната федерация на дружествата по ехография в медицината и биологията (WFSUMB) изготвя препоръки за извършване на еластография при чернодробни заболявания (81). През 2017 г. EFSUMB обновява препоръките за чернодробна еластография, като фокусът е върху Shear wave методите (64). Те съобщават за нормални стойности на чернодробна плътност при здрави възрастни, измерени със 2D-SWE 4.5 – 5.5 kPa (95th percentile 6.2 kPa). Здравите мъже имат по-висока чернодробна плътност спрямо здравите жени. Индексът на телесна маса и възрастта не влияят върху плътността при възрастни без чернодробни заболявания. 2D-SWE има отлична диагностична стойност (AUROC >0.90) за откриване на напреднала фиброза (F3) и цироза (F4) при възрастни с хепатит С (64). Диагностичната стойност (AUROC) се движи между 0.85 и 0.91 за разграничаване на сигнификантна фиброза (F2) и между 0.92 и 0.98 цироза (F4), а cut-off стойностите съответно между 7.1 kPa и 8.0 kPa за F2 и между 10.1 kPa и 11.7 kPa при възрастни с хепатит В (64). В България за първи през 2018 г. Дойков в своя дисертационен труд използва pSWE и кръвни маркери за оценка на чернодробната фиброза при възрастни с хронични вирусни хепатити, алкохолна болест и НАМЧБ (1). Той съобщава за диагностична стойност на pSWE при хепатит В AUROC 0.962 (p=0.001, CI 95% 0.922-1.001) с cut-off > 24.96 kPa за F3. При пациентите с хепатит С AUROC е 0.926 (p=0.001, CI 95% 0.834-1.018) с cut-off > 25.65 kPa за F3. ROC анализ с cut-off стойности за лека и сигнификантна фиброза, не е било възможно да се извърши поради малка площ под кривата- 0.50 (1). През 2019 г. Комитова и сътрудници съобщават за cut-off 10.0 kPa с чувствителност 89% и специфичност 95% на 2D-SWE (GE, Logiq S8, E9) за цироза при 72 възрастни с хепатит С (4).

В дисертационния труд при 53 от децата с ХЧЗ (81,5%) е извършена чернодробна биопсия с диагностична цел и за оценяване степента на чернодробната фиброза. Разпределението на пациентите спрямо степента на чернодробната фиброза е следното: 11 пациенти (20,8%) нямат фиброза, 13 (24,5%) имат лека фиброза (F1), 14 (26,4%) значима

фиброза (F2), 11 (20,8%) напреднала фиброза (F3) и 4 (7,5%) са с цироза (F4). Това позволи да се направи следното групиране на пациентите: с наличие на фиброза ($\geq F1$) спрямо без фиброза; със сигнификантна фиброза ($\geq F2$) и несигнификантна фиброза ($< F2$); с напреднала фиброза ($\geq F3$) и без фиброза (F0). Поради малкия брой пациенти ROC анализ не може да се извърши по нозологични единици, както и при тези с цироза.

Cut-off стойностите за наличие на фиброза ($\geq F1$) и сигнификантна фиброза ($\geq F2$) са близки 5.86 kPa срещу 6.16 kPa с AUROC 0,773 (SE 0,063, $p=0,006$, 95% CI 0,649-0,896) за и съответно 0,888 (SE 0,047, $p<0,001$, 95% CI 0,795-0,980). Най-добра диагностична стойност с AUROC 1,00 (SE 0,000, $p<0,001$, 95% CI 1,000-1,000) има методът при разграничаване на напреднала ($\geq F3$) от липса на фиброза с cut-off $\geq 7,12$ kPa. Средните стойности на чернодробната плътност в контролната група са $4,43\pm 0,46$ kPa. Подобни стойности $3,9\pm 1,0$ kPa отчитат Pienag и сътрудници при 35 здрави деца чрез 2D-SWE.GE с абдоминален трансдюсер (208). Franchi-Abella и екип съобщават за по-високи стойности $6,94\pm 1,42$ kPa при 51 здрави деца чрез SSWE с абдоминален трансдюсер (90). Те намират cut-off ≥ 12.143 kPa за сигнификантна фиброза ($\geq F2$) срещу лека фиброза ($\leq F2$) с AUROC 0,97 (95% CI 0,9, 1,0), чувствителност 91,7% и специфичност 95,7%. За напреднала фиброза ($\geq F3$) авторите установяват cut-off $\geq 17,602$ kPa с AUROC 0,98 (95% CI 0,95, 1,0), чувствителност 75% и специфичност 100% (90). Нашите стойности за сигнификантна фиброза ($\geq F2$) $\geq 6,16$ kPa и каквато и да е фиброза ($\geq F1$) $\geq 5,86$ kPa в най-голяма степен се доближават до тези, докладвани от Gargovich и колектив при 68 деца с неалкохолен стеатохепатит (99). Те съобщават за cut-off 6,7 kPa за сигнификантна фиброза ($\geq F2$) срещу лека фиброза ($\leq F2$) с AUROC 0,97 (95% CI 0,95, 0,99), чувствителност 87% и специфичност 96%. Диагностичната стойност за разграничаване на фиброза ($\geq F1$) от липса на такава (F0) е AUROC 0,92 (95% CI 0,86, 0,98) с cut-off $\geq 5,1$ kPa (99). Tutar и сътрудници съобщават за по-високи стойности на сигнификантна фиброза ($\geq F2$) $\geq 10,4$ kPa при 76 деца с различни хронични чернодробни заболявания (296). Dhyani и екип докладват също за по-високи стойности на сигнификантна фиброза ($\geq F2$) $\geq 8,78$ kPa с чувствителност 60% и специфичност 89,5% при 24 деца с различни хронични чернодробни заболявания (62). Хроничните чернодробни заболявания в детска възраст са редки, което обяснява както нехомогенните групи, така и по-малкия брой пациенти в сравнение с възрастните пациенти.

2. Фактори, които влияят върху 2D-SWE в детска възраст

Различни фактори и особености оказват влияние върху стойностите на чернодробната плътност при деца, в това число и спецификите на различните видове хронични чернодробни заболявания. Вероятно това е и причината за нееднородните гранични стойности за фиброза при деца.

За разлика от транзиентната еластография, която значително се влияе от съдействието на пациента да задържи дишането и приема на храна (64), 2D-SWE не се влияе съществено от тези фактори (90, 129, 217). Освен това транзиентната еластография изисква десет правилни измервания, а за 2D-SWE са нужни между три и пет (64, 65). Децата трудно изпълняват команди и лежат спокойно. За това се извършваха пет измервания на гладно, при кърмачетата и по-малките деца с хранителна пауза поне 3 часа, при неспокойствие по време на сън, с неконтролирано дишане. По-големите деца са задържали дишането за секунди. При децата под 5-годишна възраст измерванията са извършвани със субкостален достъп в десен чернодробен лоб, а при тези над тази възраст с интеркостален достъп. Не се откри разлика в чернодробната плътност в зависимост от пола ($8,62 \pm 5,61$ vs. $11,54 \pm 9,20$, $p=0,339$), както и в зависимост от възрастта на участниците в проучването ($p=0,374$). Пациентите се разделиха в три възрастови групи - 0-5 години; 6-10 години и 11-17 години. Получените резултати са в съгласие с тези, докладвани от Franchi-Abella (90). Zhou и сътрудници откриват, че при деца под 60-дневна възраст с билиарна атрезия в сравнение с деца над 60-дневна възраст чернодробната плътност е по-голяма чрез 2D-SWE (329). Две проучвания, в които е използван pSWE, намират връзка за увеличаване на чернодробната плътност с възрастта (88, 170), а други две не намират такава (73, 146). В проучване с 243 здрави деца на възраст между 4 и 17 години са използвани 2D-SWE.GE, pSWE и TE (179). Измерванията, направени чрез 2D-SWE.GE, са значително по-ниски в сравнение с тези на pSWE и TE. (средни стойности 3.3, 4.1 и 4.1 kPa, съответно; $p<0.001$). Авторите откриват слаба корелация между възрастта и 2D-SWE.GE ($\rho=0.421$, $p<0.001$). Плътността нараства до групата 12-14-годишна възраст. Разлика спрямо пола се регистрира само във възрастовия диапазон 14-17 години. Момчета имат по-висока плътност и при трите вида апарати, като за 2D-SWE.GE е 4.27 vs 3.62 kPa ($p=0.002$). По отношение на индекса на телесна маса значима връзка има само при деца с наднормено тегло в определени възрастови групи, а именно между 8 и 11 (3.35 vs 4.45 kPa, $p=0.01$) и

между 15 и 17 години (3.78 vs 4.64 kPa, $p=0.008$) (179). При нашата група пациенти не се установява зависимост между стойностите на чернодробната плътност и индекса на телесна маса ($p=0,197$). Едно проучване при деца с pSWE също не открива връзка между ИТМ и стойностите от еластографията (88). Установи се силна връзка между еластографията и стойностите на директния ($r=0,800$, $p<0.001$) и общия билирубин ($r=0,738$, $p<0.001$) и умерена връзка при АСАТ ($r=0,641$, $p<0.001$) и АЛАТ ($r=0,518$, $p<0.001$). При кърмачета с билиарна атрезия Zhou и екип съобщават за корелация между възрастта, стойностите на директния и индиректния билирубин корелират с чернодробната плътност ($p<0.001$), а стойностите на АСАТ и АЛАТ не ($p<0.05$) (329). Стойностите на АСАТ корелират с тези на еластографията при проучване с pSWE при деца с НАМЧБ и тумори ($p=0.0032$, $p=0.0045$) (150). Значителната некроинфламаторна активност (повишение на трансaminaзите пет пъти над нормата), наличието на холестаза и конгестия сигнификантно повлияват чернодробната плътност, измерена чрез транзиентна еластография (64). Същите принципи важат и за останалите видове еластография, но в точно каква степен липсват достатъчно проучвания.

3. Значение на кръвните маркери

Кръвните маркери се разделят на клас I, директни маркери на фиброза, и клас II, индиректни маркери и комбинирани. Индиректните маркери включват: АЛАТ, отношението АСАТ/АЛАТ, отношението АСАТ/тромбоцити (APRI), отношението FIB-4, FibroTest-ActiTest.

Серумното ниво на АЛАТ е един от първите маркери за оценка на чернодробното засягане (249). Pradat и екип доказват, че измерването на АЛАТ е клинично полезно, тъй като има висока чувствителност и специфичност (АЛАТ ≥ 2.5 N предсказва патологична чернодробна хистология) (219). Но стойностите на АЛАТ се влияят от много фактори – пол, ИТМ, употреба на хепатотоксични медикаменти (220, 6). Последните клинични препоръки за диагностициране и лечение на неалкохолната стеатозна болест в детска възраст на Северноамериканското дружество по детска гастроентерология, хепатология и хранене (NASPGHAN) от 2017 г. приемат за нормални стойности в детска възраст на АЛАТ 22 IU за момичета и 26 IU за момчета, независимо от референтните стойности на изследващата лаборатория (309). За момента най-добрият скрининг за НАМЧБ се състои в

динамично проследяването повишени стойности на АЛАТ > 22 IU за момичета и > 26 IU за момчета. Трайно повишен АЛАТ > 2X за повече от 3 месеца е алармиращ за НАСБ или друго хронично чернодробно заболяване. Стойности на АЛАТ > 80 IU говорят за сериозно чернодробно заболяване.

Тринадесет от децата в нашата група с НАМЧБ (59,1%) имат повишени стойности на АЛАТ.

Отношението АСАТ/АЛАТ е валидирано при различни чернодробни заболявания (291, 296) при възрастни и отношение >1 е предиктивно за цироза (101, 251).

Отношението АСАТ/АЛАТ не може да разграничи нито сигнификантна фиброза (\geq F2) ($p=0,210$), нито напреднала фиброза (\geq F3) ($p=0,092$). Получените от нас резултати са в съгласие с тези, публикувани от други колективи при деца с НАМЧБ (322, 321, 322). Yang и колектив изследват АСАТ/АЛАТ, APRI, FIB-4 при 77 деца с хистологично доказана НАМЧБ. Според степента на фиброза те разделят пациенти на такива с лека фиброза ($<$ F2) и със сигнификантна фиброза (\geq F2). Няма статистическа значима разлика на стойностите на АСАТ/АЛАТ в двете групи 0.52 ± 0.16 vs. 0.57 ± 0.31 ($p= 0.802$). Маркерите APRI и FIB-4 значително се различават в двете групи (0.67 ± 0.54 vs 0.78 ± 0.38 , $p = 0.032$ и съответно 0.24 ± 0.12 vs 0.31 ± 0.21 , $p = 0.010$). Площта под кривите им (AUROC) е 0.70 за APRI и 0.81 за FIB-4 (317). През 2019 г. Varakat и съавтори изследват FIB-4, APRI и АСАТ/АЛАТ при 166 деца с хроничен С хепатит, при които е проведена и чернодробна биопсия (21). Те разделят децата спрямо хистологичната находка на такива без фиброза (F0), с лека (F1, F2) и напреднала фиброза (F3, F4, F5), използвайки ISHAK класификацията. За напреднала фиброза cut-off стойностите са за FIB-4 >0.27 (AUC \pm SE 0.828 \pm 0.068; Sensitivity 0.73; Specificity 0.85), APRI >0.68 (AUC \pm SE 0.816 \pm 0.070; Sensitivity 0.67; Specificity 0.91) и АСАТ/АЛАТ >1.42 (AUC \pm SE 0.590 \pm 0.090; Sensitivity 0.27; Specificity 0.98) (21).

Отношението АСАТ/тромбоцити = APRI е разработено през 2003 г. от Wai и екип, които намират стойност 0.89 за напреднала фиброза/цироза (310).

През 2006 г. Sterling и сътрудници разработват нов индекс за оценка на чернодробна фиброза при 832 възрастни коинфектирани с HIV и HCV, наречен Fibrosis 4 score (FIB-4) (278). Индексът се изчислява въз основа на годините, стойностите на АСАТ, АЛАТ и тромбоцитите. Изследователите използват маркера за определяне на напреднала

фиброза ($\geq F3$). Те намират, че стойност под 1.45 изключва F3, а над или равна на 3.25 има положителна предиктивна стойност 65% и специфичност 97%. Площта под кривата за определяне на F3 е 0.765 (278). По-късно FIB-4 започва да се прилага при пациенти с хепатит С.

В настоящия дисертационен труд се откри следната диагностична стойност на APRI AUROC 0,778 (SE 0,065, $p=0,001$, 95% CI 0,651-0,906) и FIB-4 AUROC 0,735 (SE 0,071, $p=0,004$, 95% CI 0,596-0,873) за отдиференциране на сигнификанта ($\geq F2$) от лека фиброза ($<F2$). При cut-off стойности за сигнификантна фиброза за APRI и FIB-4 това са съответно 0,45 (чувствителност 82,8% и специфичност 82,6%) и 0,21 (чувствителност 82,8% и специфичност 82,6%). Площта под кривата за напреднала фиброза ($\geq F3$) е за APRI AUROC 0,879 (SE 0,078, $p=0,001$, 95% CI 0,726-1,000) и FIB-4 AUROC 0,761 (SE 0,097, $p=0,026$, 95% CI 0,570-0,951). Cut-off стойностите, над които има напреднала фиброза за APRI и FIB-4, са 0,70 (чувствителност 86,7%, специфичност 90,9%) и 0,15 (чувствителност 73,3%, специфичност 63,6%). Cut-off стойностите за разграничаване на сигнификантна ($\geq F2$) от напреднала фиброза ($\geq F3$) от FIB-4 се припокриват 0,21 и 0,15.

Опитът с APRI в детска възраст е значително по-малък, а резултатите са крайно разнородни. От една страна, това може би се дължи на различни норми на АСАТ в различните възрастови групи, както и на разнородната група чернодробни заболявания в детска възраст. В голяма част от публикациите авторите не информират каква стойност на АСАТ приемат за норма, в другата част приемат АСАТ 40 IU/l за норма (88, 63). В дисертационния труд за норма на АСАТ е прието: над 1г. - под 40 IU/l; под 1г. - под 61 IU/l.

Получените резултати за сигнификантна ($\geq F2$) и напреднала фиброза ($\geq F3$) за APRI са съответно 0,45 и 0,75 и се доближават в най-голяма степен с тези, получени при деца с вирусни хепатити с cut-off за фиброза ≥ 0.5 (173), ≥ 0.656 за фиброза $\geq F2$ (216), ≥ 0.83 за фиброза $\geq F2$ (328), както и при трансплантирани деца на десетата година след трансплантацията cut-off ≥ 0.45 за APRI открива значима фиброза (ISHAK score ≥ 3) (70).

При 30 деца с хроничен хепатит С Pokorska-Spiewak и екип намират cut-off стойности за сигнификантна фиброза ($\geq F2$) за FIB-4 - 0.180 и за APRI - 0.656 съответно. Кореспондиращите криви за FIB-4 и APRI са AUC 0.708 (95% CI 0.514–0.859) и 0.752 (95% CI 0.561–0.890) (109). Резултатите на FIB-4 при деца с НАМЧБ са противоречиви.

При 242 с НАМЧБ Alkhourī и екип изследват FIB-4 и APRI. Те намират, че стойностите на FIB-4 и APRI са значимо по-високи при пациентите с напреднала фиброза ($\geq F3$) в сравнение с децата с по-лека фиброза (0.32 ± 0.14 vs. 0.26 ± 0.15 , $p = 0.037$) и ($0.51 [0.39, 0.80]$ vs. $0.40 [0.30, 0.55]$ $p = 0.001$) (8). Подобни резултати получава и авторски колектив от Азия, който съобщава за значимо по-високи стойности на FIB-4 (0.24 ± 0.12 vs 0.31 ± 0.21 , $p = 0.010$) и APRI (0.67 ± 0.54 vs. 0.78 ± 0.38 , $p = 0.032$) при деца със сигнификантна фиброза в сравнение с лека фиброза, в следствие на НАМЧБ. Други проучвания установяват, че FIB-4 не може да разграничава наличието на каквато и да е фиброза, нито сигнификантна, нито напреднала (165, 126).

Стойностите на APRI и FIB-4 при деца са значително по-ниски от тези, докладвани при възрастни. Вероятно това се дължи на възрастта. Li и сътрудници изследват APRI и FIB-4 при 822 възрастни пациенти с хроничен В хепатит. Те откриват сигнификантно по-ниски стойности на тези маркери при пациенти под 30-годишна възраст в сравнение с над 30-годишна възраст (152). При специфичност $\geq 90\%$ cut-off стойностите на APRI за сигнификантна фиброза са (1.0 vs. 1.2) и цироза са (1.2 vs. 1.5). При чувствителност $\geq 90\%$ cut-off стойностите на APRI за сигнификантна фиброза са (0.2 vs. 0.4) и цироза са (0.3 vs. 0.5). При специфичност $\geq 90\%$ cut-off стойностите на FIB-4 за сигнификантна фиброза са (1.2 vs. 2.1) и цироза са (1.4 vs. 2.6). При чувствителност $\geq 90\%$ cut-off стойностите на FIB-4 за сигнификантна фиброза са (0.5 vs. 0.8) и цироза са (0.8 vs. 1.2). В друго проучване при 634 възрастни с НАМЧБ между 23 и 72 години авторите намират, че АСАТ/АЛАТ и FIB-4 имат ниска диагностична стойност (AUC 0.52 и 0.60 съответно) при пациенти под 35-годишна възраст. Освен това те съобщават, че специфичността за FIB-4 намалява с възрастта (174).

FibroTest-ActiTest комбинира шест серумни биомаркера с възрастта и пола на пациента - алфа-2-макроглобулин, хаптоглобин, аполипопротеин А1, гама-глутамил трансептидаза, общ билирубин и аланинаминотрансфераза и дава количествена оценка на фиброзата. Резултатите са приравнени към МЕТАВИР скалата. Получават се във вид на степен на фиброза (F) и степен на активност (A).

В изследваната популация диагностична стойност за разграничаване на сигнификантна ($\geq F2$) от лека фиброза ($< F2$) е AUC 0,808 (SE 0,061, $p < 0,001$, 95% CI 0,688-0,928), а за напреднала фиброза ($\geq F3$) AUC е 0,948 (SE 0,46, $p < 0,001$, 95% CI 0,857-1,000).

Получените резултати в най-голяма степен се доближават с тези на Flores-Calderon AUC 0.90 за разграничаване на напреднала фиброза (86). В проучване с 38 деца с хроничен хепатит С докладваната AUROC за сигнификантна ($\geq F2$) фиброза е 0.69, а за напреднала фиброза ($\geq F3$) 0.72 (115) De Ledinghen и екип съобщават за AUC 0.73 на FibroTest за разпознаване на цироза при деца с хронични чернодробни заболявания (55).

Най-силно с фиброзата, определена хистологично, корелира Shear-wave еластографията 0,736. Значително корелират с нея резултатите от FibroTest-ActiTest ($r=0,668$) и APRI ($r=0,510$). FIB-4 корелира умерено ($r=0,365$), а съотношението АСАТ/АЛАТ не корелира с фиброзата ($p=0,109$).

4. Значение на генетичните полиморфизми за развитието на НАМЧБ

Най-често срещаният генетичен полиморфизъм в изследваната популация (пациенти и контроли) е *GCKR* P446L. Наблюдава се при 7 пациенти в хетерозиготно състояние и при 12 в хомозиготно. Среща се и при половината от контролите – при 4 в хетерозиготно и при 1 в хомозиготно състояние. Наличието на *GCKR* P446L в хомозиготно състояние се асоциира с развитие на НАМЧБ при пациенти с метаболитен синдром ($p=0,025$). Полученият резултат е в съгласие с изредените проучвания (153, 124). По литературни данни наличието на *GCKR* P446L полиморфизма се свързва с ниски стойности на кръвната захар на гладно. Само при 1 пациент (1/19) хомозигот по *GCKR* P446L е регистрирана ниска кръвна захар – 2 mmol/l.

Вторият най-често срещан полиморфизъм е *PNPLA3* I148M. Наблюдава се при 40,9 % от пациентите, при 7 в хомозиготно и при 1 в хетерозиготно състояние. *PNPLA3* I148M се среща при 7 от контролите, при 6 от тях в хомозиготно и при 1 в хетерозиготно състояние. Наличието на *PNPLA3* I148M не се асоциира с развитие на НАМЧБ ($p=0,246$). Не се открива статистическа значима връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на АСАТ ($p=0,713$), АЛАТ ($p=0,947$), ГГТ ($p=0,841$), ТГ ($p=0,762$), холестерол ($p=0,867$), пикочна киселина ($p=0,713$), нарушена гликемия ($p=1,000$), инсулинова резистентност (НОМА index $>2,5$) ($p=0,494$). Не се открива и

статистическа значима връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и ИТМ ($p=0,788$) и наличието на хепатомегалия, установена ехографски ($p=1,000$).

През 2019 г. Карамфилова и сътрудници изследват ролята на *PNPLA3* I148M полиморфизма при 208 възрастни пациенти с НАМЧБ. Носителството на патологичния алел в сравнение с нормалния вариант корелира с наличието на преддиабет, инсулинова резистентност, дислипидемия и метаболитен синдром. *PNPLA3* I148M полиморфизмът увеличава 9.6 пъти риска от нарушения в обмяната на глюкозата, 3 пъти риска от развитие на метаболитен синдром и 2.1 пъти риска от развитие на инсулинова резистентност. Хомозиготите по патологичния алел имат значително по-високи стойности на АСАТ, АЛАТ и ГГТ в сравнение с носителите на нормалния алел и хетерозиготите. Хомозиготите по патологичния алел, както и хетерозиготите имат значително по-високи стойности на АСАТ (30.27 ± 14.47 ; 21.95 ± 10.95 ; 18.35 ± 6.18 , $p<0.05$) спрямо носителите на нормалния алел. По отношение на АЛАТ и ГГТ по-високи стойности се наблюдават само при хомозиготите по патологичния алел, но не и при хетерозиготите (131). В настоящия дисертационен труд не са открити такива зависимости вероятно поради много малкия брой изследвани деца с НАМЧБ, а именно - 22. Възможно е разликите в резултатите да се дължат и на различните възрастови групи. При възрастните пациенти честотата на метаболитния синдром нараства с годините, освен това се увеличава и експозицията на черния дроб от вредните фактори.

Най-рядко срещаният полиморфизъм е *TM6SF2* E167K. Намира се при 1 пациент с хомозиготно и при 1 в хетерозиготно състояние. Само 1 от контролите е хетерозиготен носител на полиморфизма. Наличието на *TM6SF2* E167K не се асоциира с развитие на НАМЧБ ($p=1,000$). В дисертационния си труд Карамфилова изследва освен връзката на *PNPLA3* I148M и *TM6SF2* E167K с НАМЧБ и преддиабет (2). Тя установява, че 89% от изследваните пациенти с НАМЧБ са хомозиготи по нормалния алел за *TM6SF2* и само 11% са хетерозиготни носители по патологичния *TM6SF2* E167K. Вероятно *TM6SF2* E167K се среща по-рядко в сравнение с *PNPLA3* I148M и *GCKR* P446L в българската популация.

VI. ИЗВОДИ

На базата на резултатите от изследванията в настоящия дисертационен труд и клиничното наблюдение са направени следните изводи:

1. Неинвазивните методи имат най-голяма диагностична стойност при определяне на сигнификантна и напреднала фиброза.
2. SSWE е високочувствителен и високоспецифичен метод за оценка на сигнификантна и напреднала чернодробна фиброза в детска възраст.
3. SSWE може да се използва в диагностиката на деца с ХЧЗ.
4. SSWE корелира силно с хистологичната фиброза при педиатрични пациенти с ХЧЗ, превъзхождайки кръвните маркери за фиброза.
5. SSWE не се влияе от пола, възрастта и ИТМ.
6. SSWE се влияе най-силно от стойностите на директния и общия билирубин, последвани от АСАТ и АЛАТ.
7. FibroTest е високочувствителен и високоспецифичен метод за оценка на сигнификантна и напреднала чернодробна фиброза в детска възраст.
8. FibroTest може да се използва в диагностиката на деца с ХЧЗ.
9. FibroTest превъзхожда APRI и FIB-4.
10. APRI превъзхожда FIB-4 като кръвен маркер за определяне на сигнификантна и напреднала фиброза при деца.
11. Отношението АСАТ/АЛАТ не може да отграничи наличието на каквато и да е фиброза при деца.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Shear-wave еластографията е лесно достъпен и надежден неинвазивен метод за оценка на чернодробната фиброза. Може да се използва както в диагностиката, така и при проследяването на педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.

При съмнение за наличие на ХЧЗ, прилагането на SSWE е подходящ първи метод на избор за определяне степента на чернодробна фиброза. Повишената плътност от SSWE, от своя страна, е в подкрепа на диагнозата ХЧЗ и може да бъде индикация за извършване на чернодробна биопсия и допълнителни изследвания при необходимост. Shear-wave еластографията превъзхожда кръвните маркери за оценка на чернодробната фиброза в детска възраст.

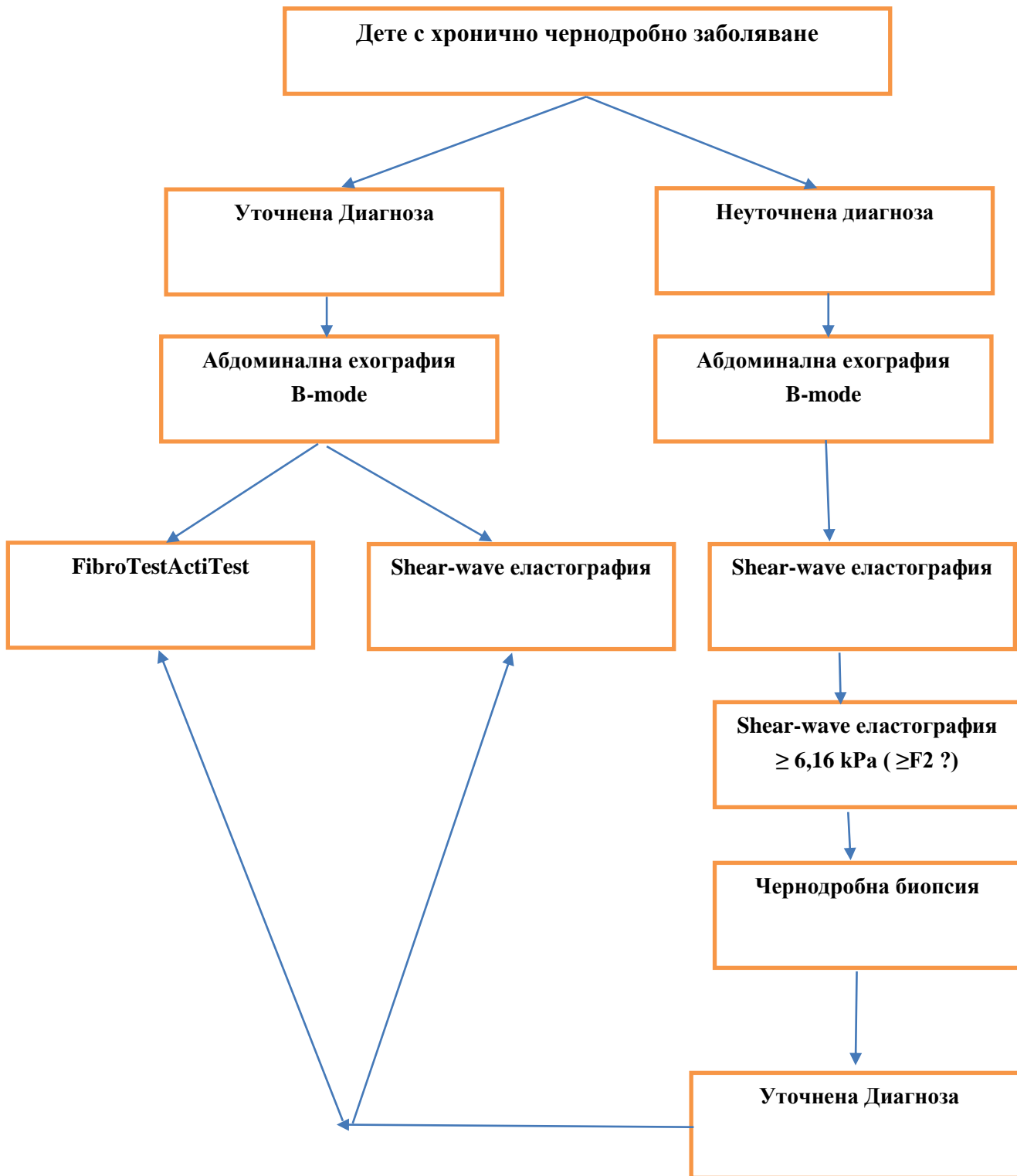
При пациентите с уточнена диагноза SSWE играе съществена роля за обективното проследяване на тяхното състояние, включително за проследяване на ефекта от провежданото лечение.

Най-често срещаните полиморфизми при деца с НАМЧБ са *GCKR* P446L и *PNPLA3* I148M. Наличието на *GCKR* P446L в хомозиготно състояние се асоциира с развитие на НАМЧБ при пациенти с метаболитен синдром. Изследването на генетични полиморфизми на предразположеност към тежко чернодробно заболяване при децата с НАМЧБ е важно с оглед определяне на рисковите пациенти и започване на лечение. Носителството на определени полиморфизми не трябва да се възприема като присъда, а по-скоро като фактор, насочващ лечението и мониторирането му отблизо.

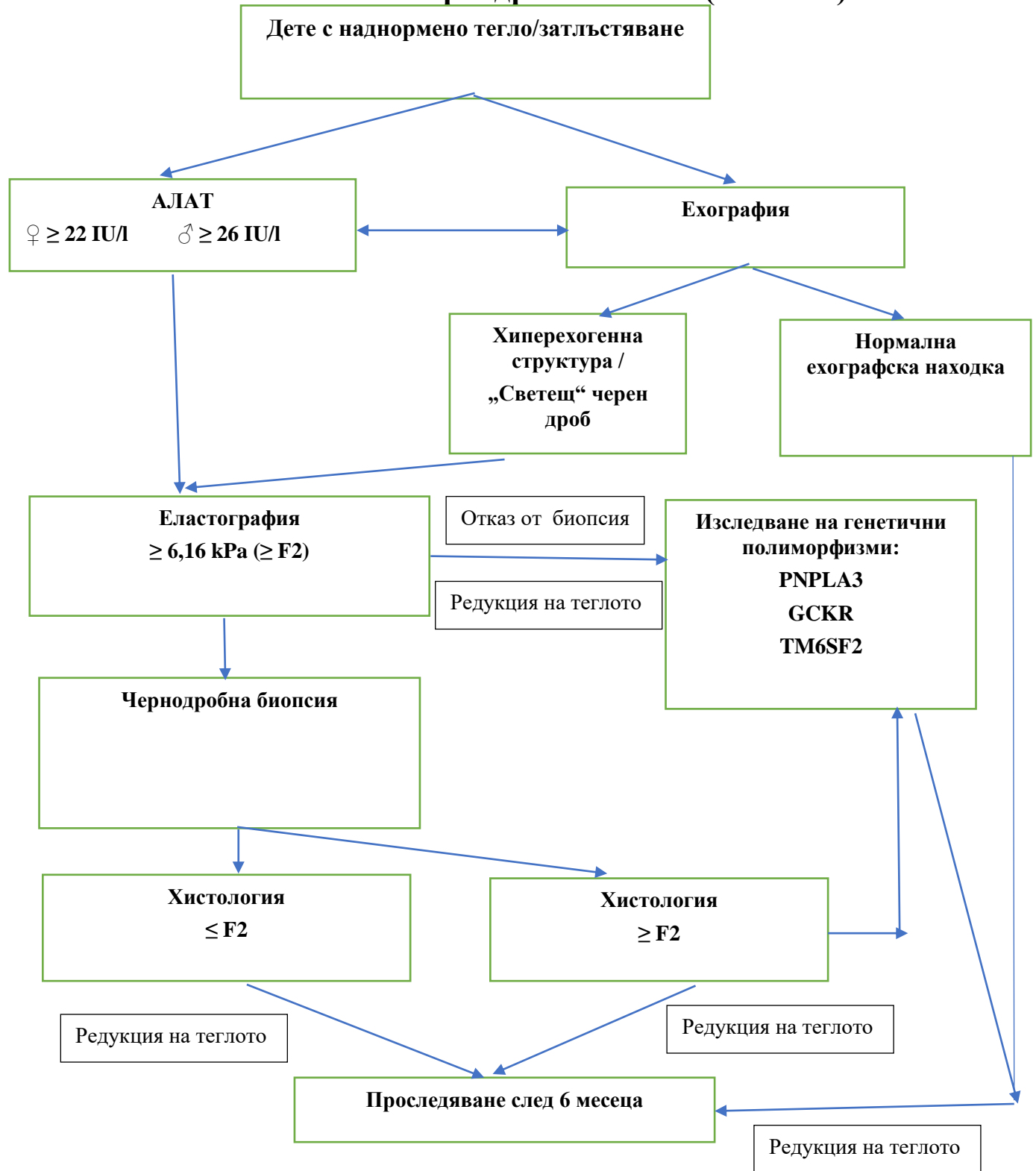
Въз основа на резултатите и направените изводи са разработени следните алгоритми за проследяване на педиатрични пациенти с ХЧЗ и НАМЧБ.

VIII. АЛГОРИТМИ

Алгоритъм за диагностициране и проследяване на деца с хронични чернодробни заболявания (ХЧЗ)



Алгоритъм за диагностициране и проследяване на деца с Неалкохолна мастна чернодробна болест (НАМЧБ)



IX. ПРИНОСИ

1. Приноси с оригинален характер

- За първи път в страната е изследвана ролята на Shear-wave еластографията за оценка на чернодробната фиброза при педиатрични пациенти.
- За първи път в страната е изследвана ролята на неинвазивните кръвни маркери – FibroTest, APRI, FIB-4, ACAT/АЛАТ за оценка на чернодробната фиброза при педиатрични пациенти.
- За първи път в страната е оценена връзката между стойностите Shear-wave еластографията и чернодробната фиброза, оценена хистологично при педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
- За първи път в страната е оценена връзката между стойностите на неинвазивните кръвни маркери – FibroTest, APRI, FIB-4, ACAT/АЛАТ, и чернодробната фиброза, оценена хистологично при педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
- За първи път в страната е намерена гранична стойност при Shear-wave еластографията за отдиференциране на фиброза от липса на такава при педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
- За първи път в страната е намерена гранична стойност при Shear-wave еластографията за отдиференциране на сигнификантна от несигнификантна фиброза при педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
- За първи път в страната е намерена гранична стойност при Shear-wave еластографията за отдиференциране на напреднала фиброза от липса на такава при педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
- За първи път в страната е изследвана ролята на генетичните полиморфизми *PNPLA3* I148M, *TM6SF2* E167K и *GSKR* P446L в развитието на НАМЧБ при педиатрични пациенти.
- За първи път в страната е предложен алгоритъм за проследяване на педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
- За първи път в страната е предложен алгоритъм за проследяване на педиатрични пациенти с НАМЧБ.

2. Приноси с потвърдителен характер

- Потвърдено е значението на Shear-wave еластографията като високочувствителен, неинвазивен метод за оценка на сигнификантна и напреднала чернодробната фиброза.
- Потвърдена е ролята на Shear-wave еластографията за определяне степента на чернодробната фиброза и проследяване на деца с ХЧЗ в ежедневната клинична практика.
- Потвърдено е превъзходството на Shear-wave еластографията над неинвазивните кръвни маркери за фиброза при пациентите с хронични чернодробни заболявания.
- Потвърдени са съобщенията в литературата, че повишените стойности на общия и директния билирубин, АСАТ и АЛАТ могат да повлияят чернодробната плътност при пациенти с ХЧЗ.

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

- Таблица 1: Разпределение на участниците по пол
- Таблица 2: Разпределение на участниците по възраст
- Таблица 3: Изследвани генетични варианти, големина на получените фрагменти и оптималната температура на анийлинг
- Таблица 4: Оптималната температура на хибридизиране на праймерите
- Таблица 5: Резултати от антропометрични, лабораторни и неинвазивни показатели при пациентите с ХЧЗ
- Таблица 6: Резултати от антропометрични, лабораторни и неинвазивни показатели при контролите
- Таблица 7: Разпределение на пациентите според диагнозата им
- Таблица 8: Разпределение на средните стойности на неинвазивните маркери на фиброза при пациентите с проведена биопсия (n=53), разделени в 2 групи – без фиброза (F0) и с фиброза ($\geq F1$), и контролите
- Таблица 9: Разпределение на средните стойности на неинвазивните маркери на фиброза при пациентите с проведена биопсия (n=53), разделени в 2 групи – без фиброза (F0) и с фиброза ($\geq F1$), и контролите.
Mann-Whitney Test.
- Таблица 10: ROC анализ по отношение на групите липса (F0) и наличие на фиброза ($\geq F1$)
- Таблица 11: Cut-off стойности за наличие на фиброза ($\geq F1$)
- Таблица 12: Разпределение на средните стойности на неинвазивните маркери на фиброза при пациентите с проведена биопсия (n=53), разделени в 2 групи – с несигнификантна фиброза ($< F2$) и със сигнификантна фиброза ($\geq F2$)
- Таблица 13: Способност на неинвазивните методи да разграничават сигнификантна ($\geq F2$) от несигнификантна фиброза ($< F2$).
Mann-Whitney test
- Таблица 14: ROC анализ по отношение на групите $< F2$ и $\geq F2$
- Таблица 15: Cut-off стойности за наличие на сигнификантна фиброза ($\geq F2$)

- Таблица 16: Разпределение на пациентите с несигнификантна ($<F2$), сигнификантна ($\geq F2$) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa.
- Таблица 17: Разпределение на пациентите с несигнификантна ($<F2$), сигнификантна ($\geq F2$) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa. Mann-Whitney test
- Таблица 18: ROC анализ по отношение на групите F0 и $\geq F3$
- Таблица 19: Cut-off стойности за наличие на напреднала фиброза ($\geq F3$)
- Таблица 20: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от Shear-wave еластографията
- Таблица 21: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от APRI
- Таблица 22: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от FIB-4
- Таблица 23: Cut-off стойности за наличие на лека ($\geq F1$), значима ($\geq F2$) напреднала фиброза ($\geq F3$) от FibroTest
- Таблица 24: Корелационна зависимост между неинвазивните показатели и степента на хистологична фиброза
- Таблица 25: Корелация между ActiTest и активност от хистологичното изследване
- Таблица 26: Зависимост на еластографията от пола. Mann-Whitney test
- Таблица 27: Зависимост на еластографията от възрастта. Kruskal-Wallis test
- Таблица 28: Корелационна зависимост между чернодробната плътност и ИТМ, АСАТ, АЛАТ, общ и директен билирубин. Spearman's rho Correlations
- Таблица 29: Разпределение по пол на пациентите с НАМЧБ и контролите
- Таблица 30: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите по тегло спрямо персентилен за BMI
- Таблица 31: Лабораторни, демографски и антропометрични показатели на пациентите с НАМЧБ и контролите
- Таблица 32: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите спрямо

стойностите на кръвната захар

- Таблица 33: Разпределение на пациентите с НАМЧБ спрямо наличието на инсулинова резистентност, дефинирана като HOMA Index > 2,5
- Таблица 34: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите спрямо стойностите на кръвното налягане
- Таблица 35: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АСАТ
- Таблица 36: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АЛАТ
- Таблица 37: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АФ
- Таблица 38: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на холестерол
- Таблица 39: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на HDL-холестерол. Fisher's Exact Test
- Таблица 40: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на LDL-холестерол
- Таблица 41: Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на ТГ. Fisher's Exact Test
- Таблица 42: Разпределение на пациентите и контролите с верифицирана ехографски хепатомегалия
- Таблица 43: Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ, ХЧЗ и контроли
- Таблица 44: Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ, ХЧЗ и контроли. Mann-Whitney test
- Таблица 45: Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ и контроли. Mann-Whitney Test
- Таблица 46: Разпределение степента на фиброза от FibroTest при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test
- Таблица 47: Разпределение степента на активност на хепатит от ActiTest при пациентите с НАМЧБ и контролите

- Таблица 48: Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите, при които е извършена чернодробна биопсия
- Таблица 49: Разпределение на степента на фиброза от хистологичното изследване при пациентите с НАМЧБ
- Таблица 50: Разпределение на наличието *GCKR* P446L в хомо- и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test
- Таблица 51: Разпределение на наличието *GCKR* P446L алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test
- Таблица 52: Разпределение на наличието *PNPLA3* I148M в хомо- и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test
- Таблица 53: Разпределение на наличието *PNPLA3* I148M алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test
- Таблица 54: Разпределение на наличието *TM6SF2* E167K в хомо- и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test
- Таблица 55: Разпределение на наличието *TM6SF2* E167K алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test
- Таблица 56: Разпределение на наличието на патологичен алел на *GCKR* P446L, *PNPLA3* I148M и *TM6SF2* E167K при пациентите с НАМЧБ и контролите
- Таблица 57: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на АСАТ. Mann-Whitney Test
- Таблица 58: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на АЛАТ. Mann-Whitney Test
- Таблица 59: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на ГГТ. Mann-Whitney Test
- Таблица 60: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на ТГ. Mann-Whitney Test

- Таблица 61: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на холестерол. Mann-Whitney Test
- Таблица 62: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на пикочната киселина. Mann-Whitney Test
- Таблица 63: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и стойностите на кръвната захар. Fisher's Exact Test
- Таблица 64: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и инсулиновата резистентност. Fisher's Exact Test
- Таблица 65: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и бъбречната функция. Fisher's Exact Test
- Таблица 66: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и ИТМ. Mann-Whitney Test
- Таблица 67: Връзка между наличието на патологичен алел на *PNPLA3* I148M и хепатомегалията, верифицирана ехографски. Fisher's Exact Test
- Таблица 68: Разпределение на фиброзата, оценена хистологично, при пациентите, носители на *PNPLA3* I148M алел

СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ

- Фиг. 1: Измерване на чернодробна плътност чрез FibroScan (TE)
- Фиг. 2: Изобразяване на нормална чернодробна плътност чрез FibroScan (TE)
- Фиг. 3: Ултразвуков апарат за Supersonic shear wave еластография
- Фиг. 4: Видове ултразвукова еластография
- Фиг. 5: Разпределение на участниците по пол
- Фиг. 6: Разпределение на пациентите според диагнозата им
- Фиг. 7: Разпределение на пациентите (n=53) спрямо степента на фиброза, определена от хистологията
- Фиг. 8: ROC анализ по отношение на групите липса (F0) и наличие на фиброза ($\geq F1$)
- Фиг. 9: Разпределение на пациентите (n=53) със сигнификантна фиброза ($\geq F2$) и несигнификантна фиброза $< F2$, определена от хистологичното изследване
- Фиг. 10: ROC анализ по отношение на групите $< F2$ и $\geq F2$
- Фиг. 11: Разпределение на пациентите с незначима ($< F2$), значима ($\geq F2$) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa
- Фиг. 12: ROC анализ по отношение на групите F0 и $\geq F3$
- Фиг. 13: Корелация между еластографията и фиброзата, определена хистологично
- Фиг. 14: Корелация между APRI и фиброзата, определена хистологично
- Фиг. 15: Корелация между FIB-4 и фиброзата, определена хистологично
- Фиг. 16: Корелация между FibroTest и фиброзата, определена хистологично
- Фиг. 17: Корелация между ActiTest и активността от хистологичното изследване
- Фиг. 18: Зависимост между директния билирубин и еластографията

Х. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации във връзка с дисертационния труд:

- **Д. Кофинова**, Д. Авджиева-Тзавелла, Хр. Желев. Оценка на чернодробната фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст-кръвни тестове. Педиатрия 2018; 2: 7-9.
- **Д. Кофинова**, Д. Авджиева-Тзавелла, Хр. Желев. Оценка на чернодробната фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст. Еластография. Педиатрия 2018; 2:10-15.
- Shentova R, Baycheva M, Hadjiiski P, **Kofinova D**, Yaneva P. Role of faecal calprotectin as a predictor of endoscopic activity in paediatric patients with ulcerative colitis. Gastroenterol Hepatol. 2020 Jan;43(1):57-61. (IF 1.126)

2. Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд:

- **Д. Кофинова**. Неинвазивни методи за оценка на чернодробната фиброза. Дни на детската гастроентерология, 21-22 април 2017, Велико Търново, лекция
- **Denitza Kofinova** Case report of a 7-year old girl with an acute hemolytic anemia and liver failure as first clinical manifestation of Wilson's disease. ESPGHAN Danube/Balkan School, Murighiol, Romania 28-31.08.2017, **Oral presentation**
- **Denitza Kofinova** Phenotypic variation in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. ESPGHAN Monothematic Conference: Management of Progressive Liver Diseases, Brussels 01-03.02.2018, **Oral presentation**
- **Д. Кофинова**. Нарушения в обмяната на жлъчните киселини. Дни на детската гастроентерология, 23-25.03.2018 Хисаря, лекция
- **Denitza Kofinova**, Mila Baycheva, Marlena Panayotova, Tihomir Todorov, Andrey Kirov, Petyo Hadzhiyski, Rayna Shentova, Penka Yaneva. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 - report of four clinical cases. 51st Annual Meeting of ESPGHAN 9–12 May 2018, Geneva, Switzerland, poster
- **Д. Кофинова**, М. Байчева, И. Йорданова, П. Хаджийски, П. Янева, М. Средкова, Д. Илиев, Е. Стефанова, З. Тодорова, Р. Савова, М. Панайотова, Д. Йорданова, А. Тодорова, Д. Авджиева-Тзавелла. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ГЕНЕТИЧНИ ПОЛИМОРФИЗМИ ПРИ ДЕЦА С НЕАЛКОХОЛНА МАСТНА ЧЕРНОДРОБНА БОЛЕСТ. XIV-ти Национален Конгрес по Педиатрия с международно участие, 27-30.09.2018, Боровец, лекция
- **Denitza Kofinova** OMI Salzburg CHOP Seminar in Pediatric Gastroenterology 12-

- 18.05.2019 **Excellent Case presentation:** Wilson's disease or not: that is the question?
- **Denitza Kofinova**, Rayna Shentova-Eneva, Mila Baycheva, Petio Hadjiiski, Penka Yaneva, Marlena Panayotova, Daniela Avdjieva-Tzavella. Non-invasive methods for assessment of liver fibrosis in paediatric patients H-P-078 European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) 52st ESPGHAN Annual Meeting 5-8 June 2019, Glasgow, Scotland, poster
 - **Д. Кофинова**, П. Хаджийски, Д. Кьосева-Шишкова, М. Байчева, Р. Шентова-Енева, П. Янева, Д. Авджиева-Тзавелла. 2D Shear wave еластография при деца с чернодробни заболявания. XXII Национален конгрес по Ултразвук в медицината 12-15 септември 2019 г, лекция

XI. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Дойков Д. Еластография в реално време като метод за оценка на плътността на черния дроб при хроничната чернодробна болест. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“. Медицински университет – Пловдив 2018
2. Карамфилова В. Нови биохимични и генетични маркери при неалкохолна стеатозна болест със затлъстяване и предиабет. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“. Медицински университет – София 2020
3. Комитова Т, Генов И, Митова Р. и сътр. ОЦЕНКА НА ЧЕРНОДРОБНАТА ФИБРОЗА-ТЕ СРЕЩУ ЧЕРНОДРОБНА БИОПСИЯ. Диагностичен и терапевтичен ултразвук 2018;2(26):57-62.
4. Комитова Т, Герджикова К, Терзиев И. и сътр. НЕИНВАЗИВНА ОЦЕНКА НА ВИРУСЕН ХЕПАТИТ С-НАСТОЯЩЕ И БЪДЕЩЕ. Диагностичен и терапевтичен ултразвук 2019;2 (27):24-25.
5. Чакърски В. и колеги Атлас по ултразвукова диагностика; Медицина и физкултура – София 2008:143-150.
6. Akbar H, Fallatah A, Serum ALT levels in a cohort of healthy blood donors and volunteers from Saudi Arabia: the influence of sex and body mass index, *Annals of Gastroenterology and Hepatology*. 2010;1:13–19.
7. Alkhouri N, Carter-Kent C, Lopez R et al. A combination of the pediatric NAFLD fibrosis index and enhanced liver fibrosis test identifies children with fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(2):150–5
8. Alkhouri N, Mansoor S, Giammaria P et al. The development of the pediatric NAFLD fibrosis score (PNFS) to predict the presence of advanced fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2014;9(8):e104558
9. Alkhouri N, Sedki E, Alisi A, Lopez R, Pinzani M, Feldstein AE, et al. Combined paediatric NAFLD fibrosis index and transient elastography to predict clinically significant fibrosis in children with fatty liver disease. *Liver Int*. 2013;33(1):79-85.
10. Anstee QM, Day CP. The genetics of nonalcoholic fatty liver disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Semin Liver Dis* 2015;35:270–290.
11. Anstee QM, Seth D, Day CP. Genetic factors that affect risk of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2016;150:1728–1744.e7.
12. Aqul A, Jonas MM, Harney S et al. Correlation of Transient Elastography With Severity of Cystic Fibrosis-related Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;64(4):505-511
13. Arden C, Petrie JL, Tudhope SJ et al. Elevated glucose represses liver glucokinase and induces its regulatory protein to safeguard hepatic phosphate homeostasis. *Diabetes*. 2011;60:3110–3120.
14. Arena U, Vizzutti F, Abraldes JG et al. Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut* 2008;57: 1288–1293.
15. Awad M-D, Shiha GE, Sallam FA, et al. Evaluation of liver stiffness measurement by fibroscan as compared to liver biopsy for assessment of hepatic fibrosis in children with chronic hepatitis C. *J Egypt Soc Parasitol* 2013;43:805–1.
16. Awai HI, Newton KP, Sirlin CB et al. Evidence and recommendations for imaging liver fat in children, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(5):765-73

17. Azzam RK, Alonso EM, Emerick KM, et al. Safety of percutaneous liver biopsy in infants less than three months old. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:639–43.
18. Bailey SS, Youssfi M, Patel M et al. Shear-wave ultrasound elastography of the liver in normal-weight and obese children. *Acta Radiol.* 2017;58(12):1511-1518
19. Bamber J, Cosgrove D, Dietrich CF et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography. Part 1: Basic Principles and Technology. *Ultraschall in Med.* 2013;34:169-184.
20. Barakat NH, Barakat SH, Ahmed N. Prediction and Staging of Hepatic Fibrosis in Children with Hepatitis C Virus: A Machine Learning Approach. *Healthc Inform Res.* 2019 Jul;25(3):173-181.
21. Baranova A, Lal P, Biringdinc A, and Younossi ZM, “Noninvasive markers for hepatic fibrosis,” *BMC Gastroenterology.* 2011 Aug 17;11:91.
22. Batailler R and Brenner DA, “Liver fibrosis,” *The Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115(2):209–218.
23. Bavu E, Gennisson JL, Couade M, et al. Noninvasive in vivo liver fibrosis evaluation using supersonic shear imaging: a clinical study on 113 hepatitis C virus patients. *Ultrasound Med Biol* 2011;37:1361–73
24. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* 2003;38:1449-1457.
25. Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ et al.. The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum Mol Genet* 2009;18:4081-4088
26. Behrens CB, Langholz JH, Eiler J, et al. A pilot study of the characterization of hepatic tissue strain in children with cystic-fibrosis-associated liver disease (CFLD) by acoustic radiation force impulse imaging. *Pediatr Radiol* 2013;43:552–7.
27. Bessissow T, Le NH, Rollet K, Afif W, Bitton A, Sebastiani G. Incidence and Predictors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Serum Biomarkers in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016 Aug;22(8):1937-44
28. Best LG, Zhang Y, Lee ET et al., C-reactive protein as a predictor of cardiovascular risk in a population with a high prevalence of diabetes: the strong heart study, *Circulation.* 2005;112(9):1289-1295.
29. Bhatt A, Rohatgi A, HDL Cholesterol efflux capacity: cardiovascular risk factor and potential therapeutic target, *Curr. Atheroscler. Rep.*2016;18(1):2.
30. Bolia R¹, Matta J, Malik R, Hardikar W. Outpatient Liver Biopsy in Children: Safety, Feasibility, and Economic Impact. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Jul;65(1):86-88
31. Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, et al. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:573–82.
32. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344:495-500.
33. Bringiotti, R. Bringiotti R, Ierardi E et al. Intestinal microbiota: the explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2014;4: 550–559.
34. Brouwer WP, van der Meer AJ et al. The impact of PNPLA3 (rs738409 C>G) polymorphisms on liver histology and long-term clinical outcome in chronic hepatitis B patients. *Liver Int* 2015;35:438–447.
35. Buch S, Stickel F, Trépo E et al. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet* 2015;47: 1443–1448.

36. Cai T, Dufour JF, Muellhaupt B et al. Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *J Hepatol* 2011;55:529–535.
37. Carim-Todd L, Escarceller M, Estivill X, Sumoy L. Cloning of the novel gene TM6SF1 reveals conservation of clusters of paralogous genes between human chromosomes 15q24→q26 and 19p13.3→p12. *Cytogenet Cell Genet* 2000;90:255–260.
38. Carlson J, Kowdley KV, Sullivan SD, et al. An evaluation of the potential cost-effectiveness of non-invasive testing strategies in the diagnosis of significant liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24(5): 786–791.
39. Castera L, Vergniol J, Foucher J et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343–350.
40. Chamorro AJ, Torres JL, Miron-Canelo JA et al. Systematic review with meta-analysis: the I148M variant of patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene (PNPLA3) is significantly associated with alcoholic liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40:571–581.
41. Chamoun Z, Vacca F, Parton RG, Gruenberg J. PNPLA3/adiponutrin functions in lipid droplet formation. *Biol Cell* 2013;105:219–233.
42. Chan HL, Wong GL, Choi PC, et al. Alanine aminotransferase-based algorithms of liver stiffness measurement by transient elastography (Fibroscan) for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2009;16:36–44.
43. Chekuri S, Nickerson J, Bichoupan K Liver Stiffness Decreases Rapidly in Response to Successful Hepatitis C Treatment and Then Plateaus. *PLoS One.* 2016 Jul 21;11(7):e0159413.
44. Chen S, Liao B, Zhong Z et al. Supersonic shearwave elastography in the assessment of liver fibrosis for postoperative patients with biliary atresia. *PLoS One.* 2013 Nov 18;8(11):e80652.
45. Christoph F, Dietrich, Carla Serra Maciej Jedrzejczyk, EFSUMB – European Course Book, *Ultrasound of the liver*
46. Coco B, Oliveri F, Maina AM et al. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007;14:360–369.
47. Cohen MB, HH AK, Lambers D, et al. Complications of percutaneous liver biopsy in children. *Gastroenterology* 1992;102:629–32.
48. Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, et al. Liver disease in cystic fibrosis: a prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology* 2002;36:1374–82.
49. Coppola N, Rosa Z, Cirillo G et al. TM6SF2 E167K variant is associated with severe steatosis in chronic hepatitis C, regardless of PNPLA3 polymorphism. *Liver Int* 2015;35:1959–1963.
50. Corradini SG, Burza MA, Molinaro A, Romeo S. Patatin-like phospholipase domain containing 3 sequence variant and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011;53:1776.
51. Cosgrove D, Piscaglia F, Bamber J, et al. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography, part 2: clinical applications. *Ultraschall Med* 2013; 34:238–253.
52. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28(1):S1–3.
53. Davis JN, Lê KA, Walker RW, Vikman S, Spruijt-Metz D, Weigensberg MJ, Allayee H, Goran MI. Increased hepatic fat in overweight Hispanic youth influenced by interaction

- between genetic variation in PNPLA3 and high dietary carbohydrate and sugar consumption. *Am J Clin Nutr* 2010; 92:1522-1527
54. De Franchis R. Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:762–8.
 55. De Le'dinghen V, Le Bail B, Rebouissoux L et al, Liver Stiffness Measurement in Children Using FibroScan: Feasibility Study and Comparison With Fibrotest, Aspartate Transaminase to Platelets Ratio Index, and Liver Biopsy; *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2007 45:443–450
 56. de Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C viruscoinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:175–179.
 57. De Nicola S, Dongiovanni P, Aghemo A et al. Interaction between PNPLA3 I148M variant and age at infection in determining fibrosis progression in chronic hepatitis C. *PLoS One* 2014;9 e106022.
 58. Debray D, Narkewicz MR, Bodewes FAJA et al. Cystic Fibrosis-related Liver Disease: Research Challenges and Future Perspectives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Oct;65(4):443-448.
 59. Degos F, Perez P, Roche B et al. Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: A multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). *J Hepatol* 2010;53: 1013–1021.
 60. Devaraj S, Yun JM, Adamson G et al. C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction, *Cardiovasc Res.* 2009;84(3):479-484.
 61. Dezsofi A. et al, Liver Biopsy in Children: Position Paper of the ESPGHAN Hepatology Committee; *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2015;60: 408–420
 62. Dhyani M, Gee MS, Misdraji J et al. Feasibility study for assessing liver fibrosis in paediatric and adolescent patients using real-time shear wave elastography. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2015;59(6):687–694; quiz 751.
 63. Díaz JJ, Gura KM, Roda J et al AST to Platelet Index Correlates with Hepatic Cirrhosis But Not with Fibrosis in Pediatric Patients with Intestinal Failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013 Sep; 57(3): 367–371.
 64. Dietrich CF, Bamber J, Berzigotti A et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version). *Ultraschall Med.* 2017 Apr 13
 65. Dietrich CF, Ferraioli G, Sirlin R et al. General advice in ultrasound based elastography of pediatric patients. *Med Ultrason.* 2019 Aug 31;21(3):315-326.
 66. Dietrich CF, Wehrmann T, Zeuzem S et al. [Analysis of hepatic echo patterns in chronic hepatitis C]. *Ultraschall Med* 1999; 20(1):9-14
 67. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* 2015;61:506–514.
 68. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-1351
 69. Doykov D, Andonov V, Asif U. Real Time Elastography (RTE) for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis, *Merit Research Journal* 2017;4(11):340-344

70. D'Souza RS, Neves Souza L, Isted A et al. AST-to-platelet ratio index in non-invasive assessment of long-term graft fibrosis following pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2016 Mar;20(2):222-6
71. Dubuquoy C, Robichon C, Lasnier F et al. Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *J Hepatol* 2011;55:145–153.
72. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016 Jun;64(6):1388-402
73. Eiler J, Kleinholdermann U, Albers D, et al. Standard value of ultrasound elastography using acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) in healthy liver tissue of children and adolescents. *Ultraschall Med* 2012;33:474–9.
74. Eladawy M, Tarek MK; Khaled I, Farida E Assessment of glucokinase regulatory protein rs1260326 gene variant polymorphism in the development of nonalcoholic fatty liver disease among Egyptian obese children. *Egyptian Liver Journal*. 2016 6(2):37–41.
75. El-Shabrawi MH, Mohsen NA, Sherif MM et al, Noninvasive assessment of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in Egyptian children with chronic hepatitis C virus infection using FibroTest and ActiTest. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Aug;22(8):946-51.
76. Engelmann G, Gebhardt C, Wenning D et al. Feasibility study and control values of transient elastography in healthy children. *Eur J Pediatr* 2012;171(2):353–360
77. Eslam M, Mangia A, Berg T et al. Diverse impacts of the rs58542926 E167K variant in TM6SF2 on viral and metabolic liver disease phenotypes. *Hepatology* 2016;64:34–46.
78. European Liver Transplant Registry. <http://www.eltr.org/>. Accessed June 2013.
79. Falletti E, Cussigh A, Cmet S, Fabris C, Toniutto P. PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2016;48:69–75.
80. Falletti E, Fabris C, Cmet S et al. PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver Int* 2011;31:1137–1143.
81. Ferraioli G, Filice C, Castera L, et al. WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 3: liver. *Ultrasound Med Biol*. 2015 May;41(5):1161-79.
82. Ferraioli G, Tinelli C, Dal Bello B, et al. Accuracy of real-time shear wave elastography for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis C: a pilot study. *Hepatology* 2012;56:2125–33.
83. Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver., *FASEB J* 1996; 10, 1213.
84. Fields AL, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2007;102:886–898.
85. Fitzpatrick E et al. Transient elastography is a useful noninvasive tool for the evaluation of fibrosis in paediatric chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;56(1):72–76
86. Flores-Calderón J, Morán-Villota S, Ramón-García G, et al, Non-invasive markers of liver fibrosis in chronic liver disease in a group of Mexican children. A multicenter study. *Ann Hepatol*. 2012 May-Jun;11(3):364-8.

87. Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM et al. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 2017 Sep;140(3):e20171904.
88. Fontanilla T, Canas T, Macia A, et al. Normal values of liver shear wave velocity in healthy children assessed by acoustic radiation force impulse imaging using a convex probe and a linear probe. *Ultrasound Med Biol* 2014;40:470–7.
89. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes *Hepatology*. 2008 Sep;48(3):792-8
90. Franchi-Abella S, Corno L, Gonzales E et al. Feasibility and Diagnostic Accuracy of Supersonic Shear-Wave Elastography for the Assessment of Liver Stiffness and Liver Fibrosis in Children: A Pilot Study of 96 Patients. *Radiology*. 2016 Feb;278(2):554-62.
91. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007;56:968–73.
92. Fraser A, Longnecker MP, Lawlor DA. Prevalence of elevated alanine aminotransferase among US adolescents and associated factors: NHANES 1999–2004. *Gastroenterology*. 2007;133:1814–1820
93. Friedman SL, “Liver fibrosis—from bench to bedside,” *Journal of Hepatology*. 2003;38(1):S38–S53.
94. Friedman SL, “Mechanisms of hepatic fibrogenesis,” *Gastroenterology*. 2008;134(6): 1655–1669.
95. Friedrich K, Rupp C, Hov JR et al. A frequent PNPLA3 variant is a sex specific disease modifier in PSC patients with bile duct stenosis. *PLoS One* 2013;8 e58734.
96. Friedrich K, Wannhoff A, Kattner S, Brune M, Hov JR, Weiss KH, et al. PNPLA3 in end-stage liver disease: alcohol consumption, hepatocellular carcinoma development, and transplantation-free survival. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29:1477–1484.
97. Friedrich-Rust M, Koch C, Rentzsch A et al., Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with Fontan circulation using transient elastography and biochemical fibrosis markers. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Mar;135(3):560-7.
98. Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, et al. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology* 2007;46:922–38
99. Garcovich M, Veraldi S, Di Stasio E et al. Liver Stiffness in Pediatric Patients with Fatty Liver Disease: Diagnostic Accuracy and Reproducibility of Shear-Wave Elastography. *Radiology*. 2017 Jun;283(3):820-827
100. Ghalamkari S, Sharafi H, Alavian SM Association of PNPLA3 rs738409 polymorphism with liver steatosis but not with cirrhosis in patients with HBV infection: Systematic review with meta-analysis. *J Gene Med*. 2018 Jan;20(1).
101. Giannini E, Risso D, Botta F, et al., Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease, *Archives of Internal Medicine*. 2003;163(2):218–224.
102. Goffredo M, Caprio S, Feldstein AE et al. Role of TM6SF2 rs58542926 in the pathogenesis of nonalcoholic pediatric fatty liver disease: A multiethnic study. *Hepatology* 2016;63:117–125.

103. Goldschmidt I, Di Nanni A, Streckenbach C et al. Improvement of BMI after Lifestyle Intervention Is Associated with Normalisation of Elevated ELF Score and Liver Stiffness in Obese Children. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 457-473
104. Goldschmidt I, Stieghorst H, Munteanu M et al. The use of transient elastography and non-invasive serum markers of fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplantation* 2013;17:525–534
105. Gominon AL, Frison E, Hiriart JB et al. Assessment of Liver Disease Progression in cystic Fibrosis Using Transient Elastography *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Nov 3.
106. Goran MI, Walker R, Le KA, Mahurkar S, Vikman S, Davis JN, Spruijt-Metz D, Weigensberg MJ, Allayee H. Effects of PNPLA3 on liver fat and metabolic profile in Hispanic children and adolescents. *Diabetes* 2010; 59: 3127-3130
107. Grandone A, Cozzolino D, Marzuillo P et al. TM6SF2 Glu167Lys polymorphism is associated with low levels of LDL cholesterol and increased liver injury in obese children. *Pediatr Obes* 2016; 11:115–119.
108. Grieve A, Makin E, Davenport M. Aspartate Aminotransferase-to-Platelet ratio index (APRI) in infants with biliary atresia: prognostic value at presentation. *J Pediatr Surg.* 2013 Apr;48(4):789-95
109. Grigorescu M, Rusu M, Neculoiu D et al. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:31–7.
110. Guha IN, Parkes J, Roderick P et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology.* 2008 Feb;47(2):455-60.
111. Guyot E, Sutton A, Rufat P et al. PNPLA3 rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013;58:312–318.
112. Hanquinet S, Rougemont AL, Courvoisier D, et al. Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography for the noninvasive diagnosis of liver fibrosis in children. *Pediatr Radiol* 2013;43:545–51.
113. Haukeland JW, Schreiner LT, Lorgen I et al., ASAT/ALAT ratio provides prognostic information independently of Child- Pugh class, gender and age in non-alcoholic cirrhosis, *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 2008;43(10):1241–1248.
114. He S, McPhaul C, Li JZ et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2010;285:6706–6715.
115. Hermeziu B. et al Evaluation of FibroTest-ActiTest in children with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010 Jan;34(1):16-22.
116. Hernaez R, McLean J, Lazo et al. Association between variants in or near PNPLA3, GCKR, and PPP1R3B with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:1183–90 e
117. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011;6:425–456.
118. Hodson, L. and Frayn, K.N Hepatic fatty acid partitioning. *Curr. Opin. Lipidol.* 2011;22:216–224.

119. Holmen OL, Zhang H, Fan Y et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. *Nat Genet* 2014;46:345–351.
120. Hovsepian S, Javanmard SH, Mansourian M et al. Relationship of lipid regulatory gene polymorphisms and dyslipidemia in a pediatric population: the CASPIAN III study. *Hormones (Athens)*. 2018 Mar;17(1):97-105
121. Howard T, Grosel J. Updated guidelines for lipid screening in children and adolescents. *JAAPA*. 2015 Mar;28(3):30-6.
122. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2011;286:37085–37093.
123. Huang Y, He S, Li JZ et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7892–7897.
124. Hudert CA, Selinski S, Rudolph B et al. Genetic determinants of steatosis and fibrosis progression in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2019 Mar;39(3):540-556.
125. Hyysalo J, Gopalacharyulu P, Bian H et al. Circulating triacylglycerol signatures in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with the I148M variant in PNPLA3 ('PNPLA3 NAFLD') and with obesity ('obese NAFLD'). *Diabetes* 2014; 63(1), 312–322.
126. Jackson JA, Konomi JV, Mendoza MV et al. Performance of fibrosis prediction scores in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *J Paediatr Child Health*. 2018 Feb;54(2):172-176.
127. Jarcuska P, Janicko M, Veselriny E et al, "Circulating markers of liver fibrosis progression," *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(15-16):1009–1017.
128. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 2004;279:48968–48975.
129. Jung C, Groth M, Petersen KU et al. Hepatic shear wave elastography in children under free-breathing and breath-hold conditions. *Eur Radiol*. 2017 Dec;27(12):5337-5343
130. Kaliora AC, Kalafati IP, Gioxari A et al. A modified response of NAFLD patients with non-significant fibrosis in nutritional counseling according to GCKR rs1260326. *Eur J Nutr*. 2018 Sep;57(6):2227-2235.
131. Karamfilova V, Gateva A, Assyov Y et al. PNPLA3 I148M Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2019;28: 433-438
132. Karlas T, Hempel M, Tröltzsch M et al. Non-invasive evaluation of hepatic manifestation in Wilson disease with transient elastography, ARFI, and different fibrosis scores. *Scand J Gastroenterol*. 2012 Nov;47(11):1353-61
133. Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M, Flier JS. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 2006;55:148–157.
134. Kim DS, Jackson AU, Li YK et al. Novel association of TM6SF2 rs58542926 genotype with increased serum tyrosine levels and decreased apoB-100 particles in Finns. *J Lipid Res* 2017;58:1471–1481.

135. Kim SJ, Park YG, Kim JH et al. Plasma fasting and nonfasting triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol in atherosclerotic stroke: different profiles according to low-density lipoprotein cholesterol, *Atherosclerosis* 223 (2) (2012) 463-467.
136. Kirk GD, Astemborski J, Mehta SH, et al. Assessment of liver fibrosis by transient elastography in persons with hepatitis C virus infection or HIV-hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2009;48:963–972.
137. Koenig W, High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy, *Int. J. Cardiol.* 168 (6) (2013) 5126-5134.
138. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:325–337.
139. Kovarova M, Konigsrainer I, Konigsrainer A, Machicao F, Haring HU, Schleicher E, et al. The genetic variant I148M in PNPLA3 is associated with increased hepatic retinyl-palmitate storage in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1568–E1574.
140. Kozian DH, Barthel A, Cousin E et al. Glucokinase-activating GCKR polymorphisms increase plasma levels of triglycerides and free fatty acids, but do not elevate cardiovascular risk in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Horm Metab Res* 2010;42:502-506.
141. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjaerg- Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2014;46:352–356
142. Krawczyk M, Grünhage F, Zimmer V, Lammert F. Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. *J Hepatol* 2011; 55: 299-306
143. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT et al. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation.* 1999;100(1):96-102.
144. Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li D et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res* 2005;46:2477–2487.
145. Lamireau T, Monnereau S, Martin S, et al. Epidemiology of liver disease in cystic fibrosis: a longitudinal study. *J Hepatol* 2004;41:920–5.
146. Lee MJ, Kim MJ, Han KH, et al. Age-related changes in liver, kidney, and spleen stiffness in healthy children measured with acoustic radiation force impulse imaging. *Eur J Radiol* 2013;82:e290–4.
147. Leschied JR, Dillman JR, Bilhartz J, et al. Shear wave elastography helps differentiate biliary atresia from other neonatal/infantile liver diseases. *Pediatr Radiol* 2015;45:366–75.
148. Leung DH, Khan M, Minard CG et al. Aspartate aminotransferase to platelet ratio and fibrosis-4 as biomarkers in biopsy-validated pediatric cystic fibrosis liver disease. *Hepatology* 2015;62:1576-1583
149. Leung VY, Shen J, Wong VW et al. Quantitative Elastography of Liver Fibrosis and Spleen Stiffness in Chronic Hepatitis B Carriers: Comparison of Shear-Wave Elastography and Transient Elastography with Liver Biopsy Correlation. *Radiology* 2013 Dec;269(3):910-8.
150. Lewindon PJ, Shepherd RW, Walsh MJ, et al. Importance of hepatic fibrosis in cystic fibrosis and the predictive value of liver biopsy. *Hepatology* 2011;53:193–201.
151. Li JZ, Huang Y, Karaman R, Ivanova PT, Brown HA, Roddy T, et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J Clin Invest* 2012;122:4130–4144.

152. Li Q, Lu C, Li W et al. Impact of age on the diagnostic performances and cut-offs of APRI and FIB-4 for significant fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B. *Oncotarget*. 2017 Jul 11;8(28):45768-45776
153. Lin YC, Chang PF, Chang MH, Ni YH Genetic variants in GCKR and PNPLA3 confer susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in obese individuals. *Am J Clin Nutr*. 2014 Apr;99(4):869-74.
154. Lin YC, Chang PF, Hu FC, Yang WS, Chang MH, Ni YH. A common variant in the PNPLA3 gene is a risk factor for nonalcoholic fatty liver disease in obese Taiwanese children. *J Pediatr* 2011; 158: 740-744
155. Lindblad A, Glaumann H, Strandvik B. Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology* 1999;30:1151-8.
156. Liu YL, Patman GL, Leathart JB et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of nonalcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014;61:75-81.
157. Liu YL, Reeves HL, Burt AD et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* 2014;5:4309.
158. Loeza-del-Castillo A, Paz-Pineda F, Oviedo-Cárdenas E et al. AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis. *Annals of Hepatology*. 2008;7(4): 350-357.
159. Louthan MV et al. Decreased prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in black obese children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2005;41(4):426-9.
160. Lupsor M, Badea R, Stefanescu H et al. Analysis of histopathological changes that influence liver stiffness in chronic hepatitis C. Results from a cohort of 324 patients. *J Gastrointest Liver Dis* 2008; 17:155-163.
161. Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S et al. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:8913-8918.
162. Mancina RM, Sentinelli F, Incani M et al. Transmembrane-6 superfamily member 2 (TM6SF2) E167K variant increases susceptibility to hepatic steatosis in obese children. *Dig Liver Dis* 2016;48:100-101.
163. Mancina RM, Spagnuolo R, Milano M et al. PNPLA3 148M carriers with inflammatory bowel diseases have higher susceptibility to hepatic steatosis and higher liver enzymes. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22:134-140.
164. Manco M, Bottazzo G, DeVito R, Marcellini M, Mingrone G, Nobili V. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *J Am Coll Nutr*. 2008;27:667-676.
165. Mansoor S, Yerian L, Kohli R et al. The evaluation of hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2015 May;60(5):1440-7.
166. Marcellin P, Gane E, Buti M et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet*. 2013 Feb 9;381(9865):468-75.
167. Marcellin P, Ziolk M, Bedossa P et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009;29: 242-247.
168. Marginean CO, Marginean C. Elastographic assessment of liver fibrosis in children: a prospective single center experience. *Eur J Radiol* 2012;81:e870-4.
169. Marzuillo P, Grandone A, Perrone L, del Giudice EM. Weight loss allows the dissection of the interaction between abdominal fat and PNPLA3 (adiponutrin) in the liver damage of obese children. *J Hepatol* 2013;59:1143-1144.

170. Matos H, Trindade A, Noruegas MJ. Acoustic radiation force impulse imaging in paediatric patients: normal liver values. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:684–8.
171. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39: 647-652
172. Matschinsky FM. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 2002; 1(3): S394-S404
173. McGoogan KE, Smith PB, Choi SS et al. Performance of the AST-to-platelet ratio index as a noninvasive marker of fibrosis in pediatric patients with chronic viral hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Mar;50(3):344-6
174. McPherson S, Hardy T, Dufour JF et al. Age as a Confounding Factor for the Accurate Non-Invasive Diagnosis of Advanced NAFLD Fibrosis. *American Journal of Gastroenterology.* 2017 May 112;5:740-751
175. McPherson S, Stewart SF, Henderson E et al. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease *Gut.* 2010;59(9):1265–1269.
176. Miele, L. Valenza V, La Torre G et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009;6:1877–1887.
177. Milano M, Aghemo A, Mancina RM et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene E167K variant impacts on steatosis and liver damage in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2015;62:111–117.
178. Min HK, Sookoian S, Pirola CJ, Cheng J, Mirshahi F, Sanyal AJ. Metabolic profiling reveals that PNPLA3 induces widespread effects on metabolism beyond triacylglycerol remodeling in Huh-7 hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G66–G76.
179. Mjelle AB, Mulabecirovic A, Havre RF et al. Normal Liver Stiffness Values in Children: A Comparison of Three Different Elastography Methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019 May;68(5):706-712.
180. Molleston JP, Schwimmer JB, Yates KP et al. Histological abnormalities in children with nonalcoholic fatty liver disease and normal or mildly elevated alanine aminotransferase levels. *J Pediatr* 2014; 164:707-713.e3
181. Mondul A, Mancina RM, Merlo A, Dongiovanni P, Rametta R, Montalcini T, et al. PNPLA3 I148M variant influences circulating retinol in adults with nonalcoholic fatty liver disease or obesity. *J Nutr* 2015;145:1687–1691.
182. Monti L, Manco M, Lo Zupone C, et al. Acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging with Virtual Touch Tissue Quantification in liver disease associated with cystic fibrosis in children. *Radiol Med* 2012;117:1408–18.
183. Morita T, “Heme oxygenase and atherosclerosis,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2005;25(9):1786– 1795.
184. Morse CG, McLaughlin M, Matthews L et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatic fibrosis in HIV-1-monoinfected adults with elevated aminotransferase levels on antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2015;60:1569–1578.
185. Mueller S, Sandrin L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepat Med* 2010;2:49–67.
186. Muller T, Buch S, Berg T, Hampe J, Stickel F. Distinct, alcohol-modulated effects of PNPLA3 genotype on progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011;55:732–733.

187. Murphy P, Hooker J, Ang B et al. Associations between histologic features of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and quantitative diffusion weighted MRI measurements in adults. *J Magn Reson Imaging*. 2015;41(6):1629-38.
188. Muto Y, Moriwaki H, Saito A. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1999;340:1046-1047.
189. Naveau S, Gaudé G, Asnacios A et al. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009 Jan;49(1):97-105
190. Ngo Y, Benhamou Y, Thibault V et al. An accurate definition of the status of inactive hepatitis B virus carrier by a combination of biomarkers (FibroTest-ActiTest) and viral load. *PLoS One*. 2008 Jul 2;3(7):e2573
191. Ngo Y, Munteanu M, Messous D et al. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem*. 2006 Oct;52(10):1887-96
192. Nischalke HD, Berger C, Luda C et al. The PNPLA3 rs738409 148M/M genotype is a risk factor for liver cancer in alcoholic cirrhosis but shows no or weak association in hepatitis C cirrhosis. *PLoS One* 2011;6 e27087.
193. Nobili V, Alisi A, Vania A, The pediatric NAFLD fibrosis index: a predictor of liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*. 2009 May 1;7:21.
194. Nobili V, Bedogni G, Donati B. et al. The I148M variant of PNPLA3 reduces the response to docosahexaenoic acid in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Medicinal Food* 2013;16(10): 957-960.
195. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):160-7
196. Nobili V, Vizzutti F, Arena U, Abraldes JG, Marra F, Pietrobattista A, et al. Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2008;48(2):442-8.
197. Noruegas MJ, Matos H, Goncalves I, et al. Acoustic radiation force impulse-imaging in the assessment of liver fibrosis in children. *Pediatr Radiol* 2012;42:201-4.
198. O'Doherty RM, Lehman DL, Télémaque-Potts S, Newgard CB. Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia *Diabetes*. 1999;48:2022-7.
199. Oliveri F, Coco B, Ciccorossi P et al. Liver stiffness in the hepatitis B virus carrier: a non-invasive marker of liver disease influenced by the pattern of transaminases. *World J Gastroenterol* 2008;14: 6154-6162.
200. Palmer CN, Maglio C, Pirazzi C et al. Paradoxical lower serum triglyceride levels and higher type 2 diabetes mellitus susceptibility in obese individuals with the PNPLA3 148M variant. *PLoS One* 2012;7:e39362.
201. Palmer ND, Musani SK, Yerges-Armstrong LM et al. Characterization of european ancestry nonalcoholic fatty liver disease associated variants in individuals of African and Hispanic descent. *Hepatology* 2013;58:966-75.
202. Pan Q, Zhang RN, Wang YQ, Zheng RD, Mi YQ, Liu WB, et al. Linked PNPLA3 polymorphisms confer susceptibility to nonalcoholic steatohepatitis and decreased viral load in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2015;21:8605-8614.

203. Pavlovic V, Zhang H, Hardikar W. et al. Transient Elastography in Assessment of Liver Fibrosis in Children with Chronic Hepatitis B: 'PEG-B-ACTIVE' Liver Elasticity Substudy. *HEPATOLOGY*. 2016;64(1):P-1772
204. Peters SA, den Ruijter HM, Bots ML, Moons KG, Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. 2012 Feb;98(3):177-84.
205. Petersen KF, Dufour S, Feng J, Befroy D, Dziura J, Dalla Man C, Cobelli C, Shulman GI. Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:18273-18277
206. Petta S, Maida M, Grimaudo S et al. TM6SF2 rs58542926 is not associated with steatosis and fibrosis in large cohort of patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Liver Int* 2016;36: 198–204.
207. Petta S, Miele L, Bugianesi E et al., "Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease," *PLoS ONE*. 2014;9(2):e87523.
208. Pienar C, Velea PI, Ciuca I, et al. P181 Two dimensional shear wave elastography in children: linear versus convex probe. *Arch Dis Child* 2017;102:A104
209. Pikula A, Beiser AS, Wang J et al., Lipid and lipoprotein measurements and the risk of ischemic vascular events: framingham Study, *Neurology*. 2015;84(5):472-479.
210. Pineda JA, Recio E, Camacho A, et al. Liver stiffness as a predictor of esophageal varices requiring therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients with cirrhosis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;51:445–449.
211. Pinto RB, Schneider AC, da Silveira TR. Cirrhosis in children and adolescents: An overview. *World J Hepatol* 2015 March 27;7(3): 392-405
212. Pinzani M, Rombouts K, and Colagrande S, "Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management," *Journal of Hepatology*. 2005;42(1):S22–S36.
213. Pinzani M, Vizzutti F, Arena U, and Marra F, "Technology Insight: noninvasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography," *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. 2008;5(2):95–106.
214. Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Stahlman M, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol* 2012;57:1276–1282.
215. Pirazzi C, Valenti L, Motta BM et al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet* 2014;23:4077–4085.
216. Pokorska-Śpiewak M, Kowalik-Mikołajewska B, Aniszewska M et al. Novel serum biomarkers modified by the body mass index z-score for the detection of liver fibrosis and steatosis in children with chronic hepatitis C *BMC Infect Dis*. 2017 May 23;17(1):361
217. Popescu A, Lupusoru R, Bende F et al., The influence of food intake on liver stiffness measurements obtained by two 2D-SWE methods. *Ultraschall in Med* 2016;37: PS4_16
218. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344–55.
219. Pradat P, Alberti A, Poynard T et al., "Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study," *Hepatology*. 2002;36(4): 973–977.
220. Prati D, Taioli E, Zanella A. et al., Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels *Annals of Internal Medicine*. 2002;137(1): 1–9.

221. Puente Á, Cabezas J, López Arias MJ Influence of sustained viral response on the regression of fibrosis and portal hypertension in cirrhotic HCV patients treated with antiviral triple therapy. *Rev Esp Enferm Dig.* 2017 Jan;109(1):17-25.
222. Rath T, Menendez KM, Kugler M, et al. TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease. *Dig Liver Dis* 2012;44:780–7.
223. Rehm JL, Connor EL, Wolfgram PM, Eickhoff JC, Reeder SB, Allen DB. Predicting hepatic steatosis in a racially and ethnically diverse cohort of adolescent girls. *J Pediatr.* 2014;165(2):319-25.e1.
224. Rojas-Feria, M., Castro, M., Suárez, E., Ampuero, J. & Romero-Gómez, M. Hepatobiliary manifestations in inflammatory bowel disease: the gut, the drugs and the liver. *World J. Gastroenterol.* 2013;42:7327–7340.
225. Romeo S, Kozlitina J, Xing C et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461–1465.
226. Romeo S, Sentinelli F, Cambuli VM et al. The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. *J Hepatol* 2010;53:335-338
227. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology.* 2004 Dec;127(6):1704-13.
228. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:894–903.
229. Rousseaux J, Duhamel A, Dumont J et al. The n-3 long-chain PUFAs modulate the impact of the GCKR Pro446Leu polymorphism on triglycerides in adolescents. *J Lipid Res.* 2015 Sep;56(9):1774-80.
230. Rubio A et al., Noninvasive procedures to evaluate liver involvement in HIV-1 vertically infected children. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Nov;49(5):599-606.
231. Rudolph CD, Winter HS, et al., NASPGN Executive Council NT. NASPGN guidelines for training in pediatric gastroenterology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:S1–26.
232. Sagnelli C, Merli M, Uberti-Foppa C et al. TM6SF2 E167K variant predicts severe liver fibrosis for human immunodeficiency/hepatitis C virus co-infected patients, and severe steatosis only for a non-3 hepatitis C virus genotype. *World J Gastroenterol* 2016;22: 8509–8518
233. Salameh H, Raff E, Erwin A et al. PNPLA3 gene polymorphism is associated with predisposition to and severity of alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2015;110:846–856.
234. Saldera K, Nargis F, Mahmood T, Shaikh S. SHEAR WAVE ELASTOGRAPHY; ASSESSMENT OF LIVER FIBROSIS IN A PATIENT OF CHRONIC LIVER DISEASE ASSOCIATED INFECTED BY HEPATITIS B AND C. *The Professional Medical Journal.* 2016;23(1):99-103.
235. Samir AE, Dhyani M, Vij A, et al. Shearwave elastography for the estimation of liver fibrosis in chronic liver disease: determining accuracy and ideal site for measurement. *Radiology* 2015;274(3):888–896.
236. Sanchez-Pulido L, Ponting CP. TM6SF2 and MAC30, new enzyme homologs in sterol metabolism and common metabolic disease. *Front Genet* 2014;5:439.
237. Santoro N, Caprio S, Pierpont B et al. Hepatic De Novo Lipogenesis in Obese Youth Is Modulated by a Common Variant in the GCKR Gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100:E1125–E1132.

238. Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E et al. A common variant in the patatinlike phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology* 2010;52:1281-1290
239. Santoro N, Savoye M, Kim G, et al. Hepatic fat accumulation is modulated by the interaction between the rs738409 variant in the PNPLA3 gene and the dietary omega6/omega3 PUFA intake. *PLoS ONE* 2012;7:e37827
240. Santoro N, Zhang CK, Zhao H et al. Variant in the glucokinase regulatory protein (GCKR) gene is associated with fatty liver in obese children and adolescents. *Hepatology* 2012;55:781–9.
241. Santos JL, Choquette M, Bezerra JA. Cholestatic liver disease in children. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010 Feb;12(1):30-9.
242. Saroli Palumbo C, Restellini S, Chao CY et al. Screening for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Inflammatory Bowel Diseases: A Cohort Study Using Transient Elastography. *Inflamm Bowel Dis.* 2019 Jan 1;25(1):124-133.
243. Sartini A, Gitto S, Bianchini M et al. Non-alcoholic fatty liver disease phenotypes in patients with inflammatory bowel disease. *Cell Death Dis.* 2018 Jan 24;9(2):87.
244. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007;316:1331-1336.
245. Schwimmer JB, Behling C, Angeles JE et al. Magnetic Resonance Elastography Measured Shear Stiffness as a Biomarker of Fibrosis in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2017 Nov;66(5):1474-1485.
246. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics.* 2006;118(4):1388-93.
247. Schwimmer JB, Middleton MS, Behling C et al. Magnetic resonance imaging and liver histology as biomarkers of hepatic steatosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2015;61(6):1887-95
248. Schwimmer JB, Newton KP, Awai HI et al. Paediatric gastroenterology evaluation of overweight and obese children referred from primary care for suspected non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Nov;38(10):1267-77.
249. Sebastiani G and Alberti A, “Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy,” *World Journal of Gastroenterology*, 2006;12 (23):3682–3694.
250. Sebastiani G, “Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver diseases: implementation in clinical practice and decisional algorithms,” *World Journal of Gastroenterology*, 2009;15 (18):2190–2203.
251. Sebastiani G, Vario A, Guido M et al., Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C, *Journal of Hepatology*, 2006;44(44):686–693.
252. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Alberti A. Sequential algorithms combining non-invasive markers and biopsy for the assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B, *World Journal of Gastroenterology*, 2007;13(4):525–531.
253. Serai SD, Trout AT, Sirlin C, Elastography to Assess the Stage of Liver Fibrosis in Children: Concepts, Opportunities, and Challenges. *Clinical Liver Disease* 2017;9(1):5–10
254. Sevastianova K, Kotronen A, Gastaldelli A, Perttila J, Hakkarainen A, Lundbom J, et al. Genetic variation in PNPLA3 (adiponutrin) confers sensitivity to weight loss-induced decrease in liver fat in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:104–111.

255. Shen J, Wong GL, Chan HL, Chan RS, Chan HY, Chu WC, et al. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:139–146.
256. Shen QL, Chen YJ, Wang ZM et al. Assessment of liver fibrosis by Fibroscan as compared to liver biopsy in biliary atresia. *World J Gastroenterol*. 2015 Jun 14;21(22):6931-6.
257. Shen Y, Wu L, Xi B, Liu X et al. GCKR variants increase triglycerides while protecting from insulin resistance in Chinese children. *PLoS One*. 2013;8(1):e55350.
258. Shiina T. JSUM ultrasound elastography practice guidelines: basics and terminology. *J Med Ultrason*. 2013;40(4):309–23
259. Silva Jr RG, Fakhouri R, Nascimento TV et al., Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008;2(1):15–19.
260. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:325–334.
261. Sini M, Sorbello O, Civolani A, Liggi M, Demelia L. Non-invasive assessment of hepatic fibrosis in a series of patients with Wilson's Disease. *Dig Liver Dis*. 2012 Jun;44(6):487-91
262. Slosberg ED, Desai UJ, Fanelli B et al. Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 2001;50:1813-1820
263. Smagris E, BasuRay S, Li J et al. Pnpla3I148M knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology* 2015;61:108–118
264. Snyder N, Gajula L, Xiao SY et al., “APRI: an easy and validated predictor of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C,” *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2006;40(6):535–542.
265. Snyder N, Nguyen A, Gajula L, et al., The APRI may be enhanced by the use of the FIBROSpect II in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis C, *Clinica Chimica Acta* 2007;381(2):119–123.
266. Sokol RJ, Durie PR. Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28 Suppl 1:S1-13.
267. Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL et al. A nonsynonymous gene variant in adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res* 2009;50:2111–2116.
268. Sookoian S, Castano GO, Pirola CJ. PNPLA3 I148M variant is associated with metabolic stress-response phenotype in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2015;61:1769.
269. Sookoian S, Castaño GO, Scian R et al. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. *Hepatology* 2015;61:515–525.
270. Sookoian S, Pirola CJ. PNPLA3, the history of an orphan gene of the potato tuber protein family that found an organ: the liver. *Hepatology* 2014;59:2068–2071.
271. Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, Hirschhorn JN. PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology* 2010;52:904–912.

272. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet* 2011;7 e1001324.
273. Sporea I, Grădinaru-Tașcău O, Bota S et al. How many measurements are needed for liver stiffness assessment by 2D-Shear Wave Elastography (2D-SWE) and which value should be used: the mean or median? *Med Ultrason* 2013;15(4):268-272.
274. Sporea I, Sirli R. Hepatic Elastography Using Ultrasound Waves. 2016:8
275. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* 2006;55:569-578.
276. Stattermayer AF, Traussnigg S, Dienes HP et al. Hepatic steatosis in Wilson disease—Role of copper and PNPLA3 mutations. *J Hepatol* 2015;63:156–163.
277. Stefanescu AC, Pop TL, Stefanescu H, Miu N Transient elastography of the liver in children with Wilson's disease: Preliminary results. *J Clin Ultrasound*. 2016 Feb;44(2):65-71.
278. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43:1317–25.
279. Stevenson M, Lloyd-Jones M, Morgan MY, Wong R. Non-Invasive Diagnostic Assessment Tools for the Detection of Liver Fibrosis in Patients with Suspected Alcohol-Related Liver Disease: A Systematic Review and Economic Evaluation *Health Technol Assess*. 2012;16(4):1-174
280. Stickel F, Buch S, Lau K, zu Schwabedissen HM, Berg T, Ridinger M, et al. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology* 2011;53:86–95.
281. Stojkovic IA, Ericson U, Rukh G et al. The PNPLA3 Ile148Met interacts with overweight and dietary intakes on fasting triglyceride levels. *Genes Nutr* 2014;9:388.
282. Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH. Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. *The Journal of pediatrics*. 2000;136(6):727-3
283. Szybowska P, Wojcik M, Starzyk JB, Sztefko K Enhanced liver fibrosis (ELF) test in obese children with ultrasound-proven liver steatosis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2015 Dec;36(7):700-5.
284. Tam CH, Ma RC, So WY et al. Interaction effect of genetic polymorphisms in glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) on metabolic traits in healthy Chinese adults and adolescents. *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):765-9.
285. Tan HL, Zain SM, Mohamed R et al. Association of glucokinase regulatory gene polymorphisms with risk and severity of non-alcoholic fatty liver disease: an interaction study with adiponutrin gene. *J Gastroenterol*. 2014 Jun;49(6):1056-64.
286. Tang CS, Zhang H, Cheung CY et al. Exome-wide association analysis reveals novel coding sequence variants associated with lipid traits in Chinese. *Nat Commun* 2015;6:10206.
287. The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* 1994;20:15-20.
288. Tian C, Stokowski RP, Kershenobich D, Ballinger DG, Hinds DA. Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 2010;42:21–23.

289. Tomita H. et al., Acoustic Radiation Force Impulse Imaging for Assessing Graft Fibrosis After Pediatric Living Donor Liver Transplantation: A Pilot Study. *LIVER TRANSPLANTATION*. 2013;19:1202–1213.
290. Tong J, Guo J, Hu J, Hou S, Zhang Y, Li Q. Correlation between patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 gene polymorphisms and liver cirrhosis in a Chinese han population with chronic hepatitis B. *Hepat Mon* 2014;14:e18943.
291. Toniutto P, Fabris C, Bitetto D et al., “Role of AST to platelet ratio index in the detection of liver fibrosis in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation,” *Journal of Gastroenterology and Hepatology*”. 2007;22(11):1904–1908.
292. Trépo E, Gustot T, Degre D, Lemmers A, Verset L, Demetter P, et al. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2011;55:906–912.
293. Trépo E, Guyot E, Ganne-Carrie N et al. PNPLA3 (rs738409 C>G) is a common risk variant associated with hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 2012;55:1307–1308.
294. Trépo E, Nahon P, Bontempi G et al. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. *Hepatology* 2014;59:2170–2177.
295. Trépo E, Pradat P, Potthoff A et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;54:60–69.
296. Tutar O, Beşer OF, Adaletli I, et al. Shear wave elastography in the evaluation of liver fibrosis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;58(6):750–755.
297. Ünlüsoy Aksu A, Sarı S, Yılmaz G et al. Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index in children with cholestatic liver diseases to assess liver fibrosis. *Turk J Pediatr*. 2015 Sep-Oct;57(5):492-7.
298. Valenti L, Alisi A, Galmozzi E, Bartuli A, Del Menico B, Alterio A, Dongiovanni P, Fargion S, Nobili V. I148M patatinlike phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52: 1274-1280
299. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1209–1217.
300. Valenti L, Maggioni P, Piperno A et al. Patatin-like phospholipase domain containing-3 gene I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in hereditary hemochromatosis. *World J Gastroenterol* 2012;18:2813–2820.
301. Valenti L, Rumi M, Galmozzi E et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;53:791–799.
302. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A et al. TRIB1 and GCKR polymorphisms, lipid levels, and risk of ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:51-57.
303. Vergara S, Macias J, Rivero A et al. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2007;45:969–974.

304. Vigano M, Valenti L, Lampertico P et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M affects liver steatosis in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2013;58:1245–1252.
305. Viitasalo A, Pihlajamäki J, Lindi V, Atalay M, Kaminska D, Joro R, Lakka TA. Associations of I148M variant in PNPLA3 gene with plasma ALT levels during 2-year follow-up in normal weight and overweight children: the PANIC Study. *Pediatr Obes*. 2015 Apr;10(2):84-90.
306. Viitasalo A, Pihlajamäki J, Paananen J et al. Associations of TM6SF2 167K allele with liver enzymes and lipid profile in children: the PANIC Study. *Pediatr Res* 2016;79:684–688.
307. Vizzutti F, Arena U, Nobili V et al. Non-invasive assessment of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2009;8(2):89-94.
308. Vorobioff JD, Groszmann RJ. Hepatic venous pressure gradient measurement in pre-primary and primary prophylaxis of variceal hemorrhage. *Ann Hepatol* 2013;12:22–9.
309. Vos M, Abrams SH, Barlow SE et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2017 Feb;64(2):319-334.
310. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C,” *Hepatology*. 2003;38(2):518–526.
311. Walker RW, Sinatra F, Hartiala J et al. Genetic and clinical markers of elevated liver fat content in overweight and obese Hispanic children. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Dec;21(12):E790-7.
312. Welsh JA, Karpen S, Vos MB. Increasing prevalence of nonalcoholic fatty liver disease among United States adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. *The Journal of pediatrics*. 2013;162(3):496-500 e1.
313. Westheim BH, Aagaes I, Ostensen AB, et al. Effect of operator experience and frequency of procedure performance on complication rate after ultrasound-guided percutaneous liver biopsies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;57:638–43.
314. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015;148(3):547-55.
315. Wyllie Robert, Jeffrey S. Hyams, Marsha Kay. *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*, 4th Edition. 2011:840
316. Xanthakos SA, Podberesky DJ, Serai SD et al. Use of magnetic resonance elastography to assess hepatic fibrosis in children with chronic liver disease. *The Journal of pediatrics*. 2014;164(1):186-8.
317. Yang HR, Kim HR, Kim MJ et al. Noninvasive parameters and hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2012 Apr 7;18(13):1525-30.
318. Yang LY, Fu J, Peng XF et al. Validation of aspartate aminotransferase to platelet ratio for diagnosis of liver fibrosis and prediction of postoperative prognosis in infants with biliary atresia. *World J Gastroenterol*. 2015 May 21;21(19):5893-900.
319. Yoon H. J. et al, Shear wave elastography in the evaluation of rejection or recurrent hepatitis after liver transplantation. *Eur Radiol* (2013) 23:1729–1737.

320. Yoon HM, Kim SY, Kim KM et al. Liver Stiffness Measured by Shear-wave Elastography for Evaluating Intrahepatic Portal Hypertension in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Jun;64(6):892-897.
321. Yoon HM, Suh CH, Kim JR. Diagnostic Performance of Sonographic Features in Patients With Biliary Atresia: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Ultrasound Med.* 2017 Oct;36(10):2027-2038.
322. Yoon JH, Lee JM, Joo I, et al. Hepatic fibrosis: prospective comparison of MR elastography elastography and US shear-wave elastography for evaluation. *Radiology* 2014;273(3):772–782.
323. Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:665–74.
324. Zampino R, Coppola N, Cirillo G et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M variant is associated with liver steatosis and fat distribution in chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2015;60:3005–3010.
325. Zarski JP, Sturm N, Guechot J et al. Comparison of nine blood tests and transient elastography for liver fibrosis in chronic hepatitis C: The ANRS HCEP- 23 study. *J Hepatol* 2012;56:55–62.
326. Zelber-Sagi S, Salomone F, Yeshua H et al, “Non-high-density lipoprotein cholesterol independently predicts new onset of non-alcoholic fatty liver disease,” *Liver International.* 2014;34(6):e128–e135.
327. Zhan C, Shi M, Yang Y et al., Prevalence and risk factors of carotid plaque among middle-aged and elderly adults in rural Tianjin, China, *Sci. Rep.* 2016;6: 23870.
328. Zhijian Y, Hui L, Weiming Y et al. Role of the Aspartate Transaminase and Platelet Ratio Index in Assessing Hepatic Fibrosis and Liver Inflammation in Adolescent Patients with HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:906026
329. Zhou LY, Jiang H, Shan QY et al. Liver stiffness measurements with supersonic shear wave elastography in the diagnosis of biliary atresia: a comparative study with grey-scale US. *Eur Radiol.* 2017 Aug;27(8):3474-3484.
330. Zhou Y, Llauradó G, Orešič M, Hyötyläinen T et al. Circulating triacylglycerol signatures and insulin sensitivity in NAFLD associated with the E167K variant in TM6SF2. *J Hepatol* 2015;62:657–663.
331. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:48–54.

ХІІ. ПРИЛОЖЕНИЯ

НЕИНВАЗИВНО ОПРЕДЕЛЯНЕ СТЕПЕНТА ЧЕРНОДРОБНАТА ФИБРОЗА ЧРЕЗ FIBROTEST-ACTITEST И SHARE WAVE ЕЛАСТОГРАФИЯ

Информирано съгласие за родителите на пациента

Получих информацията за това изследване и имах възможност да дискутирам проекта с:

Давам разрешение на:

Д-р.....(име на лекаря)

от(месторабота)

за изследване маркери на чернодробна фиброза от венозна кръв (FibroTest-ActiTest); за извършване на ехографско изследване - еластография. Имах възможност да задам допълнителни въпроси и да дискутирам следните параграфи:

2. След верифициране на резултата, бих искал да науча резултатите от

FibroTest-ActiTest и еластографията

Да / Не

3. Съгласен/а съм да предоставя:

- Анонимни клинични , отнасящи се до детето ми за регистриране в база данни

Да

/ Не

4. Прочетох приложението „Информация за пациента”

Да /

Не

Разбирам, че:

1. Името ми няма да бъде публикувано.

2. В някои случаи взетият материал за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на материал.

Име на
пациента/родителя:.....

Подпис на
пациента/родителя:.....

Дата.....

Подпис на
лекаря:.....

Дата:.....

Моля, подпишете две копия и запазете едното за Вас!

**ОЦЕНКА НА РИСКА ЗА РАЗВИТИЕ И ПРОГРЕСИЯ НА НЕАЛКОХОЛНА
ЧЕРНОДРОБНА СТЕАТОЗА ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ ЧРЕЗ НЕИНВАЗИВНИ
КЛИНИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ**

Информирано съгласие за родителите на пациента

Получих информацията за това изследване и имах възможност да дискутирам проекта с:

Давам разрешение на:

Д-р.....(име на лекаря)

от(месторабота)

за изследване на ДНК от венозна кръв, получена чрез венепункция за анализ с амплификация чрез полимеразна верижна реакция – PCR и директно секвениране; за изследване на маркери на чернодробна фиброза от венозна кръв (FibroTest-ActiTest); за извършване на ехографско изследване - еластография. Имах възможност да задам допълнителни въпроси и да дискутирам следните параграфи:

1. Осведомен/а съм , че ДНК- анализът ще се проведе с оглед да се интерпретират резултатите от анализа при детето ми..... **Да / Не**

2. След верифициране на резултата, бих искал да науча резултатите от генетичния анализ, FibroTest-ActiTest и еластографията **Да / Не**

3. Съгласен/а съм да предоставя:

- Анонимни клинични и генетични данни, отнасящи се до детето ми за регистриране в база данни **Да / Не**

4. Прочетох приложението „Информация за пациента” **Да / Не**

Разбирам, че:

1. Името ми няма да бъде публикувано.

2. В някои случаи взетият материал за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на материал.

Име на
пациента/родителя:.....

Подпис на
пациента/родителя:.....

Дата.....
.....

Подпис на
лекаря:.....

Дата:.....

Моля, подпишете две копия и запазете едното за Вас!

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Декларирам, че всички представени данни в настоящия дисертационен труд са от собствени изследвания и резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата:

гр. София

Подпис:

/Деница Кофинова/

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на Учителя доц. Христо Желев!

Благодаря на доц. Емилия Пантелеева за съветите!

Благодаря на научния си ръководител доц. Даниела Авджиева-Тзавелла за помощта и ценните съвети!

Благодаря на д-р Райна Шентова-Енева за безрезервната помощ и съвети!

Благодаря на колегите от Клиниката по детска гастроентерология на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ ЕАД, гр. София за съдействието при реализирането на настоящия труд!

Благодаря за съдействието и помощта на Иглика Йорданова и проф. Албена Тодорова от Генетична медико-диагностична лаборатория „Геника“!

Благодаря на всички пациенти и техните родители!

Не на последно място благодаря на моето семейство!