



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Д-р Деница Руменова Кофинова

ОЦЕНКА НА ФИБРОЗАТА
ПРИ ХРОНИЧНИ ЧЕРНОДРОБНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ
В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ

АВТОРЕФЕРАТ

на 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



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Д-р Деница Руменова Кофинова

ОЦЕНКА НА ФИБРОЗАТА
ПРИ ХРОНИЧНИ ЧЕРНОДРОБНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ
В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ

АВТОРЕФЕРАТ

на 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

Дисертационният труд е написан на 146 стандартни машинописни страници и е онагледен с 68 таблици и 18 фигури. Библиографската справка съдържа 331 литературни източника, от които 8 на кирилица и 302 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Катедрен съвет към Катедрата по педиатрия, Медицински университет – София.

Дисертантът е асистент към Клиника по гастроентерология на Катедрата по педиатрия към Медицински университет – София и работи в същата клиника в СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“-ЕАД, гр. София.

Публичната защита ще се състои на **19.06.2020** година от 14:00 часа в Аудиторията на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“-ЕАД, гр. София, бул. „Акад. Иван Гешов“ № 11, пред научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Иван Олегович Литвиненко, дм – вътрешен член за МУ-София

Членове:

Проф. д-р Ваня Недкова Недкова-Коларова, дм – външен член за МУ-София

Доц. д-р Миглена Димитрова Георгиева, дм – външен член за МУ-София

Доц. д-р Даниела Мирчева Авджиева-Тзавелла, дм – вътрешен член за МУ-София

Проф. д-р Тоньо Илиев Шмилев, дм – външен член за МУ-София

Резервни членове:

Проф. д-р Стефан Недев Стефанов, дм – вътрешен член за МУ-София

Проф. д-р Вили Кръстева Стоянова, дм – външен член за МУ-София

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет към Медицински университет – София, както и на интернет страницата на Медицински университет – София.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Съдържание

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ	5
ВЪВЕДЕНИЕ	7
I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
1. Цел	8
2. Задачи	8
II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	9
1. Дизайн на проучването	9
2. Материал и методи	9
2.1. Клиничен материал	9
2.2. Биологичен материал	9
2.3. Методи за уточняване на диагнозата в отделните групи	10
2.3.1. Параклинични методи	10
2.3.2. Образни методи	11
2.4. Методи за оценка на фиброзата	11
2.4.1. Инвазивни методи за оценка на фиброзата	11
2.4.2. Неинвазивни методи за оценка на фиброзата	12
2.5. Изследване на генетичните полиморфизми в гените PNPLA3, GSKR и TM6SF2 Изследване на генетични полиморфизми в гените PNPLA3, GSKR и TM6SF2, които се асоциират с развитие на НАМЧБ, НАСХ и фиброза	13
2.6. Статистически методи	17
III. РЕЗУЛТАТИ	19
1. Задача 1, 2 и 3	19
2. Задача 4	29
3. Задача 5	31
4. Задача 6	34
5. Задача 7	36
IV. ОБСЪЖДАНЕ	44
1. Значение на 2D-SWE в детска възраст	44
2. Фактори, които влияят върху 2D-SWE в детска възраст	45

3. Значение на кръвните маркери	46
4. Значение на генетичните полиморфизми за развитието на НАМЧБ	48
V. ИЗВОДИ	50
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
VII. АЛГОРИТМИ	52
VIII. ПРИНОСИ	54
IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ	56
X. БЛАГОДАРНОСТИ	58

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АЛАТ	–	<i>Аланин аминотрансфераза</i>
АФ	–	<i>Алкална фосфатаза</i>
АСАТ	–	<i>Аспартат аминотрансфераза</i>
ГГТ	–	<i>Гамаглутамил трансфераза</i>
ИКМ	–	<i>Извънклетъчен матрикс</i>
НАМЧБ	–	<i>Неалкохолна мастна чернодробна болест</i>
НАСХ	–	<i>Неалкохолен стеатохепатит</i>
ТГ	–	<i>Триглицериди</i>
ХЧЗ	–	<i>Хронични чернодробни заболявания</i>
2D-SWE	–	<i>Two Dimensional Shear-wave Elastography</i>
ARFI	–	<i>Acoustic Radiation Force Impulse Elastography</i>
AUROC	–	<i>Area Under the ROC Curve</i>
ELISA	–	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FIB-4	–	<i>Fibrosis-4 Index</i>
GCKR P446L	–	<i>Glucokinase regulatory protein</i>
HBV	–	<i>Hepatitis B Virus</i>
HCV	–	<i>Hepatitis C Virus</i>
HDL-C	–	<i>High-density lipoprotein cholesterol</i>
LDL-C	–	<i>Low-density lipoprotein cholesterol</i>
PNPLA3 I148M	–	<i>Patatin-like phospholipase domain containing 3 protein</i>
pSWE	–	<i>point Shear-wave Elastography</i>
rtSWE	–	<i>Real-time shear wave elastography</i>
ROC	–	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SD	–	<i>Standard deviation</i>
SDS	–	<i>Standard deviation score</i>
SSWE	–	<i>Supersonic Shear-wave Elastography</i>
TE	–	<i>Transient elastography</i>
TM6SF2 E167K	–	<i>Transmembrane 6 superfamily member 2</i>

ВЪВЕДЕНИЕ

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. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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.

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, АРРІ, 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 горезброените 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 P446L 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.

II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Дизайн на проучването

Едноцентрово, проспективно случай-контрола проучване, изследващо ролята на Supersonic shear wave еластографията и кръвните маркери – АСАТ/АЛАТ, АРРІ, 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.

Материал и методи

Клиничен материал

В проучването са включени 75 пациенти – 34 момичета (44%) и 42 момчета (56%) на възраст под 18 години, 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).

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 ТЕ буфер при -20°C в ДНК-банката на Генетична медико-диагностична лаборатория „Геника”.

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.

Параклинични методи

А) Пациенти с хронични чернодробни заболявания – Проведени са стандартни биохимични (Аспартат аминотрансфераза (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, следните стойности:

Холестерол >5,18 mmol/l

HDL-Холестерол >1,16 mmol/l <1,036 mmol/l 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 чер-нодробни 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.

Изчислен е НОМА индекс по формулата:

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

Резултат 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.

Образни методи

След извършване на конвекционална 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.

Методи за оценка на фиброзата

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 патоанатом 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 хематок-

силин-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

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) FibroTest-ActiTest – 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 транс-пептидаза, общ билирубин и аланинаминотрансфераза и дава количествена оценка на фиброзата. За целта е взета кръв в две епруветки с Clot activator

(2x5 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:

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

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

Г) FIB-4

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

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

Д) Съотношение АСАТ/АЛАТ

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

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±3,78 години.

Обработката на биологичния материал и ДНК анализът са извършени в колораборация 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.

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.

Методи

Преданалитична обработка на материала

Изолитране 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 изолитрането на ДНК:

Лизис буфер (pH=7.4): NH₄Cl – 155mM; KHCO₃ – 10mM; Na₂EDTA – 0.1mM

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM; Na₂EDTA – 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

Оценка на качеството на изолитраната ДНК

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

Апаратура:

Спектрофотометър BioPhotometer, Eppendorf.

Аналитична обработка на материала

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

Принцип:

Полимеразната верижна реакция (ПВР) е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулярната диагностика. Състои се в *in vitro* ензимно

намножаване (амплификация) на избрани ДНК нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции (т. нар. зародиши или праймери). Методът е разработен от Кару Mullis през 1985 г. Продължителността на ПВР зависи от нуждите на експеримента, дължината и специфичността на намножавания участък. След всеки цикъл количеството на матрицата ДНК нараства в геометрична прогресия. В резултат на 30 такива цикъла се получава около 106-108 копия от избрания участък.

Намножаване на специфични участъци от PNPLA3, GCKR и TM6SF2 гените

В настоящото изследване за ензимното намножаване с ПВР на специфични участъци от PNPLA3, GCKR и TM6SF2 гените бяха използвани праймерни секвенции по дизайн на ГМДЛ „Геника“. Големината на получените фрагменти и оптималната температура на анилинг са представени в таблица 1.

Ген	Генетичен вариант кДНК, АК	Размер на продукта (б.дв.)	T(опт.) (0C)
PNPLA3	c.444C>G, p.I148M	333 б.дв.	60
GCKR	c.1337C>T, p.P446L	488 б.дв.	60
TM6SF2	c.499C>T, p.E167K	485 б.дв.	62

Табл. 1. Изследвани генетични варианти, големина на получените фрагменти и оптималната температура на анилинг

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

Оптималната програма за провеждане на ПВР за намножаване на изследваните участъци от PNPLA3, GCKR и TM6SF2 гените, както и оптималната температура на хибридиране на праймерите (Топт) е различна за отделните фрагменти е показани на табл. 2.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	940С	5 min	1
Денатурация	940С	30 sec	35
Хибридизация на праймерите	Топт 0С	30 sec	
Синтез на нова верига	720С	30 sec	
Краен синтез	720С	5 min	1

Табл. 2. Оптималната температура на хибридизиране на праймерите

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.

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).

Статистически методи

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

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. 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.

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.

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.

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.

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.

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 специализирания 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.

III. 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 3 и 4 и фигури 1 и 2 са представени демографските, хистологичните и лабораторните показатели на участниците в проучването.

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

Табл. 3. Резултати от антропометрични, лабораторни и неинвазивни показатели при пациентите с ХЧЗ

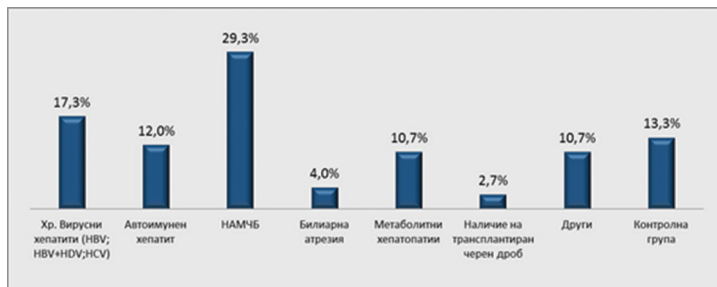
Контроли						
Показател	N	Mean	Median	SD	Min	Max
Възраст	10	10,90	12,00	5,22	2,00	17,00
Ръст	10	147,25	157,50	30,22	87,50	187,00
ИТМ, Ре	10	60,60	64,35	25,07	10,80	86,30
АСАТ	10	18,50	18,50	3,72	14,00	26,00
АЛАТ	10	11,50	10,50	3,14	7,00	17,00
ГГТ	10	11,50	10,00	5,21	7,00	25,00
АФ	10	160,60	166,00	66,74	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

Табл. 4. Резултати от антропометрични, лабораторни и неинвазивни показатели при контролите

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

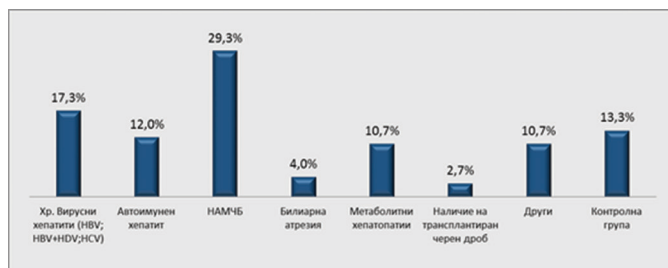
Табл. 5. Разпределение на пациентите според диагнозата им

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. 5, фиг. 1).



Фиг. 1. 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 цироза (F4) (фиг. 2).



Фиг. 2. Разпределение на пациентите (n=53) спрямо степента на фиброза, определена от хистологичното изследване

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

Табл. 6. 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 – 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

Табл. 7. 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

Средните стойности на чернодробната плътност, APRI сора и FIB-4 при пациентите с 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 статистически 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 сора и отношението АСАТ/АЛАТ при пациентите с фиброза ($\geq F1$) спрямо тези при контролите са

значимо по-високи (11,12±8,04 vs. 4,43±0,46, p<0,001), (2,35±6,11 vs. 0,18±0,08, p<0,001), (0,89±0,39 vs. 1,67±0,39, p<0,001). Няма статистическа разлика в стойностите на FIB-4 при пациентите с фиброза (≥F1) и при контролите (0,42±0,48 vs. 0,24±0,14, p=0,561) (табл. 6, 7).

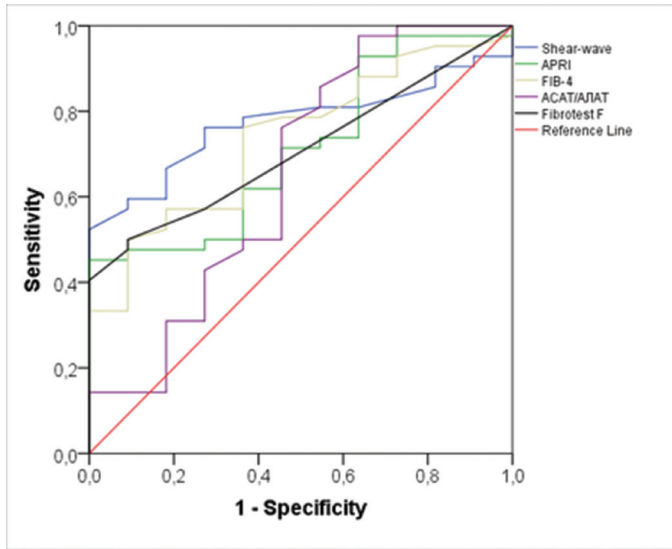
Таблица 8 и фигура 3 показват способността на всеки тест да разграничава наличието на фиброза (≥F1) от липсата на такава (F0). Най-голяма площ под кривата (AUC) има Shear-wave еластографията 0,773 (SE 0,063, p=0,006, 95% CI 0,649–0,896), последвана от FIB-4 AUC 0,736 (SE 0,076, p=0,017, 95% CI 0,587–0,885), 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 отидиференцира наличието от липсата на фиброза (p=0,119). На таблица 9 са показани граничните стойности, над които имаме фиброза (≥F1). При cut-off стойност ≥5,86 kPa от еластографското изследване е налице фиброза (≥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 ≥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. 9).

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

Табл. 8. ROC анализ по отношение на групите с липса (F0) и наличие на фиброза (≥F1)

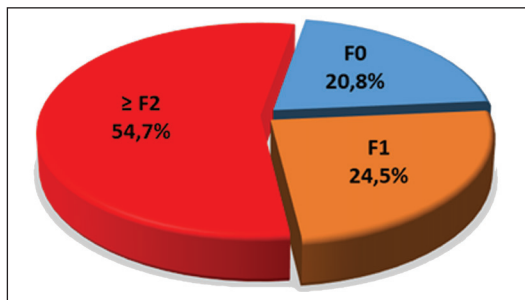
Показател	Cut-off	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV
Shear-wave	5,86	0,762	0,727	0,444	0,914
APRI	0,40	0,619	0,636	0,304	0,867
FIB-4	0,15	0,762	0,636	0,412	0,889
АСАТ/АЛАТ	0,72	0,548	0,545	0,240	0,821
Fibrotest	F0	0,571	0,727	0,307	0,889

Табл. 9. Cut-off стойности за наличие на фиброза (≥F1)



Фиг. 3. 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 с напреднала фиброза ($\geq F3$) (фиг. 4, фиг. 6, табл. 14, табл. 15). В таблици 10, 11 и 12 и фигура 5 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 с чувствителност 82,8% и специфичност 82,6% е налице 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. 13).



Фиг. 4. Разпределение на пациентите (n=53) със сигнификантна фиброза (≥F2) и несигнификантна фиброза <F2, определена от хистологичното изследване

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
≥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

Табл. 10. 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 (≥F2)

	<F2	<F2	≥F2
	≥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
ACAT/АЛТ	0,210	<0,001	<0,001
FibroTest	<0,001	0,951	0,007
ActiTest	0,015	<0,001	<0,001

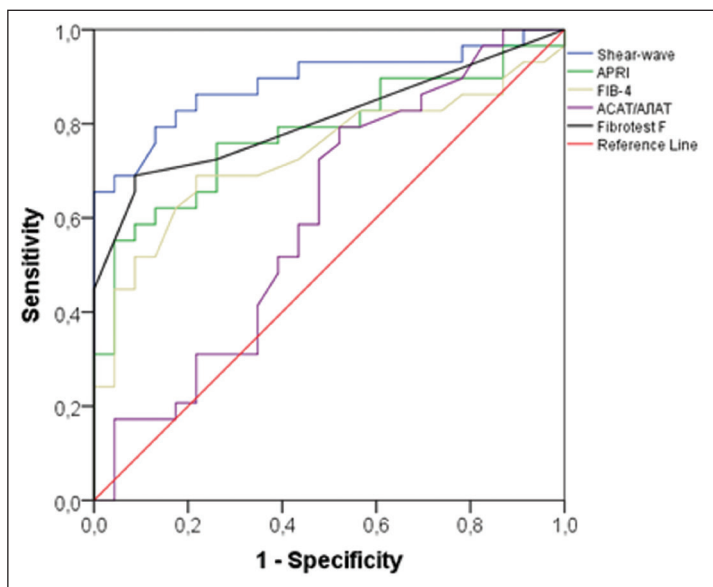
Табл. 11. Способност на неинвазивните методи да разграничават сигнификантна (≥F2) от несигнификантна фиброза (<F2). Mann-Whitney test

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
ACAT/АЛТ	0,602	0,082	0,210	0,442	0,762
Fibrotest	0,808	0,061	<0,001	0,688	0,928

Табл. 12. ROC анализ по отношение на групите <F2 и ≥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
ACAT/АЛТ	0,72	0,586	0,565	0,776	0,347
Fibrotest	F2	0,724	0,739	0,872	0,523

Табл. 13. Cut-off стойности за наличие на сигнификантна фиброза (≥F2)



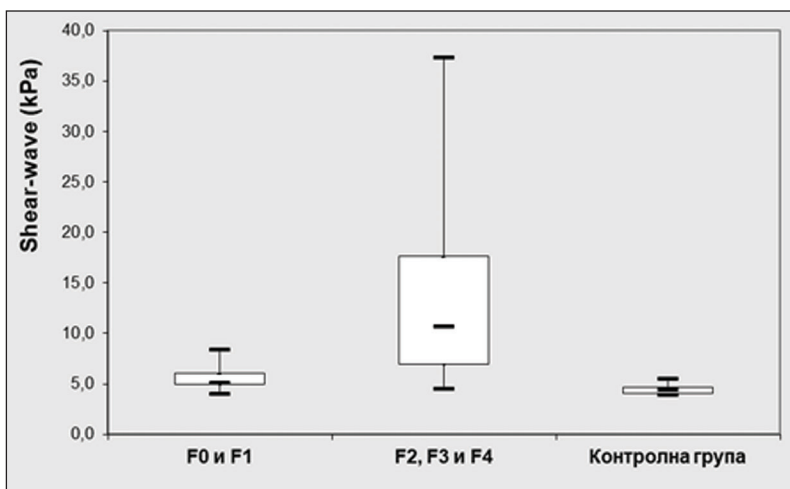
Фиг. 5. ROC анализ по отношение на групите <F2 и ≥F2

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

Табл. 14. Разпределение на пациентите с несигнификантна (<F2), сигнификантна (≥F2) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa

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

Табл. 15. Разпределение на пациентите с несигнификантна (<F2), сигнификантна (≥F2) фиброза и контролите спрямо чернодробната плътност, измерена в kPa. Mann-Whitney test



Фиг. 6. 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 квантил. Дължината на кутиите представят интерквантилния 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

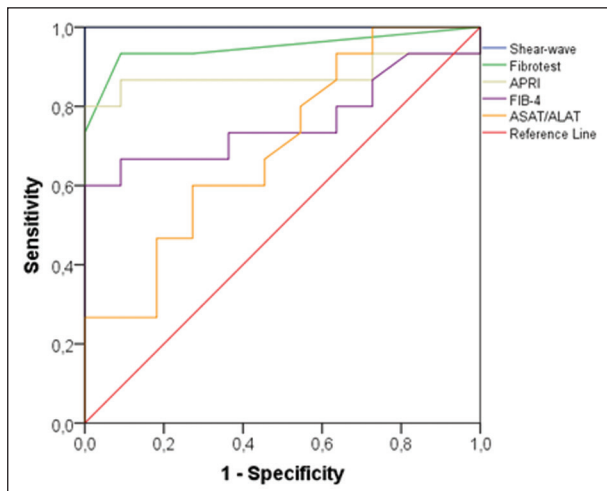
Неинвазивните методи за оценка на фиброзата имат най-добра AUC със специфичност и сензитивност да разграничават напреднала фиброза ($\geq F3$) от липса на фиброза (F0), демонстрирано на таблици 16, 17 и фигура 7. Най-голяма площ под кривата има Shear wave еластографията 1,00 (SE 0,000, $p < 0,001$, 95% 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.

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

Табл. 16. ROC анализ по отношение на групите F0 и $\geq F3$

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

Табл. 17. Cut-off стойности за наличие на напреднала фиброза ($\geq F3$)



Фиг. 7. ROC анализ по отношение на групите F0 и \geq F3

Задача 4

В таблица 18 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.

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

Табл. 18. Cut-off стойности за наличие на лека (\geq F1), значима (\geq F2) напреднала фиброза (\geq F3) от Shear-wave еластографията

В таблица 19 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.

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

Табл. 19. Cut-off стойности за наличие на лека (≥F1), значима (≥F2) напреднала фиброза (≥F3) от APRI

В таблица 20 са показани съответните прагови стойности на FIB-4, над които има лека (≥F1), сигнификантна (≥F2) и напреднала фиброза (≥F3) със съответните чувствителност и специфичност, негативна и позитивна предиктивна стойност.

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

Табл. 20. Cut-off стойности за наличие на лека (≥F1), значима (≥F2) напреднала фиброза (≥F3) от FIB-4

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

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

Табл. 21. Cut-off стойности за наличие на лека (≥F1), значима (≥F2) напреднала фиброза (≥F3) от FibroTest

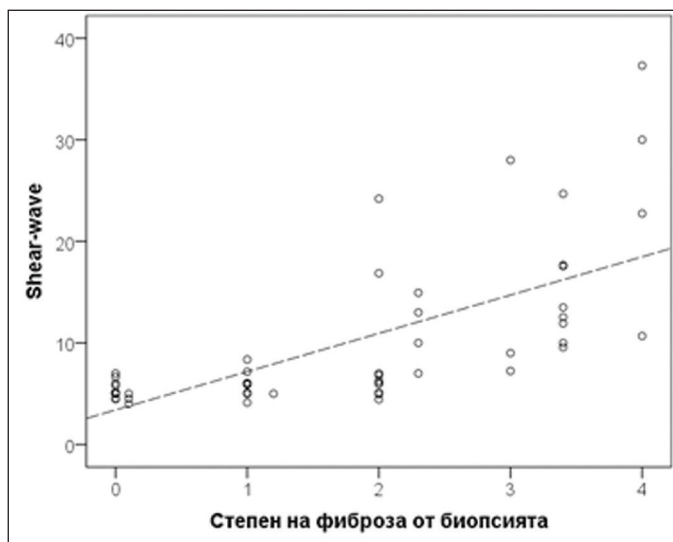
Задача 5

Чрез Spearman's rho test потърсихме корелационната зависимост между резултатите от чернодробната биопсия, еластографията и неинвазивните биомаркери. Резултатите са представени в таблица 22.

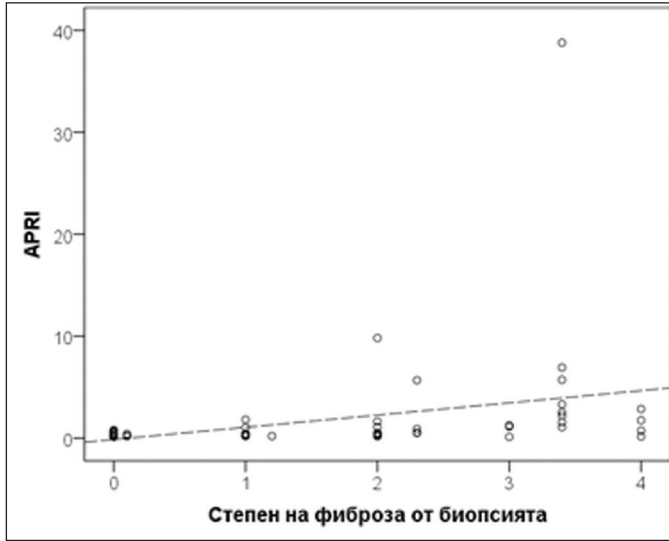
Степен на фиброза от биопсията ↔	Shear-wave	APRI	FIB-4	АСАТ/АЛАТ	FibroTest-ActiTest
R	0,736	0,510	0,365	0,222	0,668
p	<0,001	<0,001	0,007	0,109	<0,001
N	53	53	53	53	53

Табл. 22. Корелационна зависимост между неинвазивните показатели и степента на хистологична фиброза

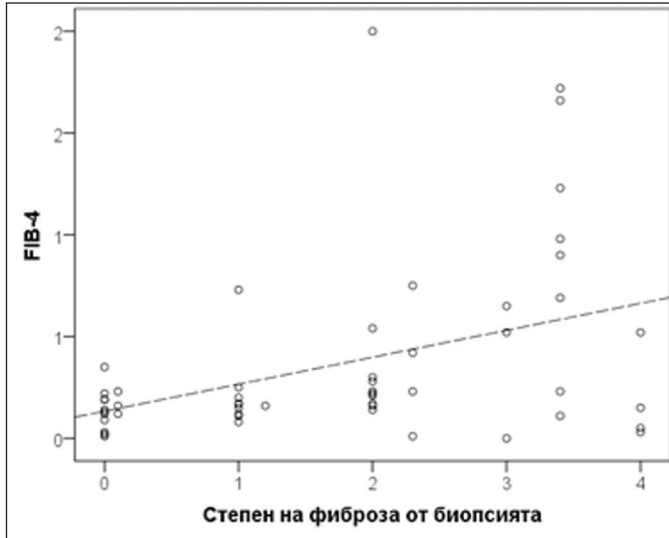
Най-силно с фиброзата, определена хистологично, корелира Shear-wave еластографията 0,736 (фиг. 8). Значително корелират с нея резултатите от FibroTest-ActiTest ($r=0,668$) (фиг. 11) и APRI ($r=0,510$) (фиг. 9). FIB-4 корелира умерено ($r=0,365$) (фиг. 10), а съотношението АСАТ/АЛАТ не корелира с фиброзата ($p=0,109$).



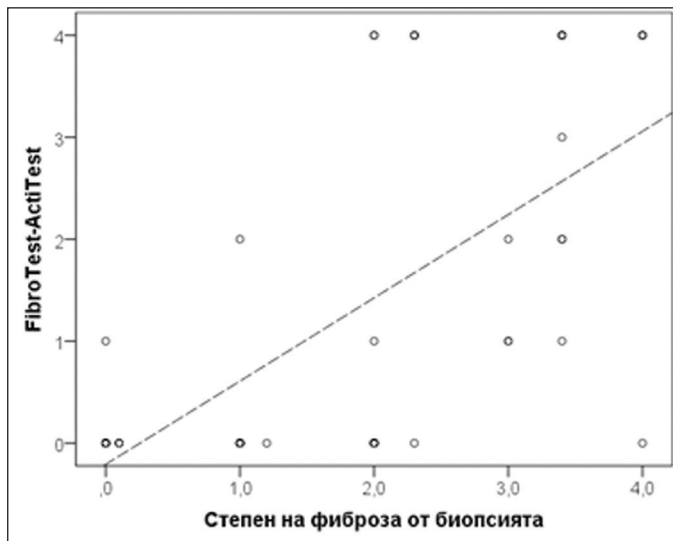
Фиг. 8. Корелация между еластографията и фиброзата, определена хистологично



Фиг. 9. Корелация между APRI и фиброзата, определена хистологично



Фиг. 10. Корелация между FIB-4 и фиброзата, определена хистологично

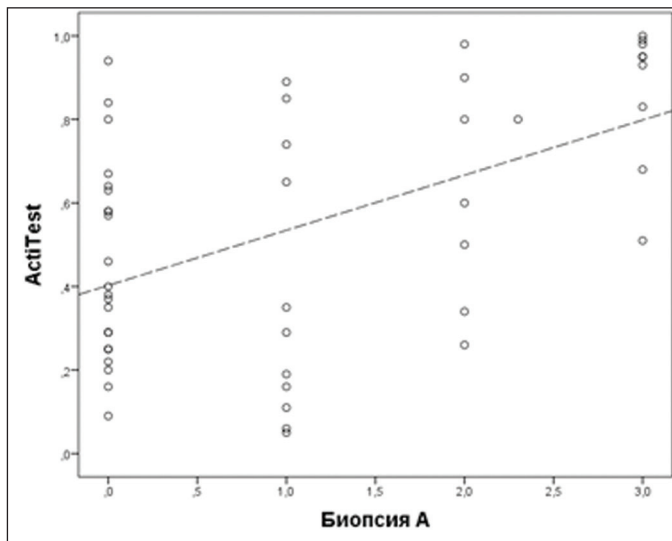


Фиг. 11. Корелация между FibroTest и фиброзата, определена хистологично

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

Табл. 23. Корелация между ActiTest и активност от хистологичното изследване

Активността от ActiTest корелира умерено ($r=0,470$, $p=0,001$) с активността, определена хистологично (табл. 23, фиг. 12).



Фиг. 12. 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. 24). 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. 25).

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	

Табл. 24. Зависимост на еластографията от пола. Mann-Whitney test

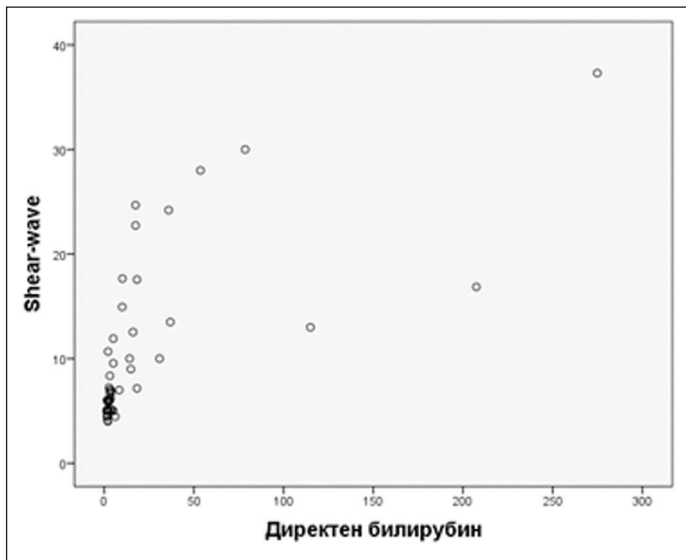
Група	Възрастова група	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
С биопсия	0–5 г.	15	12,30	7,16	10,11	5,08	37,30	0,374
	6–10 г.	15	9,14	6,00	6,35	4,00	24,68	
	11–17 г.	23	8,93	6,06	6,13	4,44	28,00	

Табл. 25. Зависимост на еластографията от възрастта. Kruskal-Wallis test

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. 13) 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. 26).

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

Табл. 26. Корелационна зависимост между чернодробната плътност и ИТМ, АСАТ, АЛАТ, общ и директен билирубин. Spearman's rho Correlations



Фиг. 13. 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, показани в таблици 27 и 29. Средната възраст на пациентите с НАМЧБ е $10,39 \pm 3$ години, а на контролите $10,90 \pm 5,22$ години.

Пол		НАМЧБ	Контроли	Общо	р
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%	

Табл. 27. Разпределение по пол на пациентите с НАМЧБ и контролите

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. 28).

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%

Табл. 28. Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите по тегло спрямо перцентили за ВМІ

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	

Табл. 29. Лабораторни, демографски и антропометрични показатели на пациентите с НАМЧБ и контролите

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. 30). Четирима пациенти (18,2%) имат нарушена гликемия на гладно, останалите имат нормални стойности на кръвната захар на гладно (табл. 30).

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%

Табл. 30. Разпределение на пациентите с НАМЧБ и контролите спрямо стойностите на кръвната захар

Инсулинова резистентност, дефинирана като HOMA Index $>2,5$, имат 90,9% от пациентите с НАМЧБ (табл. 31).

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

Табл. 31. Разпределение на пациентите с НАМЧБ спрямо наличието на инсулинова резистентност, дефинирана като НОМА Index >2,5

Шестнадесет от децата (72,7%) имат увеличени стойности на АСАТ (табл. 32), 9 (40,9%) – АЛАТ (табл. 33), 4 (18,2%) АФ (табл. 34).

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%

Табл. 32. Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АСАТ

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%

Табл. 33. Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АЛАТ

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%

Табл. 34. Разпределение на пациентите и контролите с повишени стойности на АФ

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. 35, 36).

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

Табл. 35. Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ, ХЧЗ и контроли

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

Табл. 36. Средни стойности на чернодробната плътност при пациенти с НАМЧБ, ХЧЗ и контроли. Mann-Whitney test

Значима фиброза ($\geq F2$) от биопсията се открива при 2 от децата (табл. 37). Останалите 80,8% (8/10) имат незначима фиброза ($< F2$), от които 2 имат лека фиброза (F1) и 6 нямат фиброза (F0).

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

Табл. 37. Разпределение на степента на фиброза от хистологичното изследване при пациентите с НАМЧБ

Изследва се разпространението на PNPLA3 I148M, TM6SF2 E167K и GCKR P446L полиморфизми при 22 пациенти с НАМЧБ и 10 здрави контроли.

Най-често срещаният генетичен полиморфизъм в изследваната популация (пациенти и контроли) е GCKR P446L (табл. 41). 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. 38).

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%	

Табл. 38. Разпределение на наличието GCKR P446L в хомо-и хетерозиготно състояние 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%	

Табл. 39. Разпределение на наличието GCKR P446L алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

Вторият най-често срещан полиморфизъм е PNPLA3 I148M (табл. 41). 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. 40).

PNPLA3		НАМЧБ	Контроли	Общо	р
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%	

Табл. 40. Разпределение на наличието PNPLA3 I148M в хомо-и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

PNPLA3 Group		НАМЧБ	Контроли	Общо	р
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%	

Табл. 41. Разпределение на наличието PNPLA3 I148M алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

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. 42, 43).

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%	

Табл. 42. Разпределение на наличието TM6SF2 E167K в хомо- и хетерозиготно състояние при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

TM6SF2		НАМЧБ	Контроли	Общо	p
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%	

Табл. 43. Разпределение на наличието TM6SF2 E167K алел при пациентите с НАМЧБ и контролите. Fisher's Exact Test

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 $>2,5$) ($p=0,494$).

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.

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.

IV. ОБСЪЖДАНЕ

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. През 2017 г. EFSUMB обновяват препоръките за чернодробна еластография, като фокусът е върху Shear wave методите. Те съобщават за нормални стойности на чернодробна плътност при здрави възрастни, измерени със 2D-SWE 4.5–5.5 kPa. 2D-SWE има отлична диагностична стойност (AUROC >0.90) за откриване на напреднала фиброза (F3) и цироза (F4) при възрастни с хепатит С.

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. 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 сигнификатна фиброза не е било възможно да се извърши поради малка площ под кривата – 0,50. 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. 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.

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 Pienar et al. при 35 здрави деца чрез 2D-SWE.GE с абдоминален трансдюсер. Franchi-Abella et al. съобщават за по-високи стойности $6,94 \pm 1,42$ kPa при 51 здрави деца чрез SSWE с абдоминален трансдюсер. Те намират cut off $\geq 12,143$ 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%. 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 et al., при 68 деца с неалкохолен стеатохепатит. 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. Tutar et al. съобщават за по-високи стойности на сигнификантна фиброза ($\geq F2$) $\geq 10,4$ kPa при 76 деца с различни хронични чернодробни заболявания. Dhyani et al. 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. Хроничните чернодробни заболявания в детска възраст са редки, което обяснява както нехомогенните групи, така и по-малкия брой пациенти в сравнение с възрастните пациенти.

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 транзитентната еластография, която значително се влияе от съдействието на пациента да задържи дишането и приема на храна, 2D-SWE не се влияе съществено от тези фактори. Освен това транзитентната еластография

изисква десет правилни измервания, а за 2D-SWE са нужни между три и пет. 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 извършване 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.

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.

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 ($r=0,518$, $p<0,001$). Установените зависимости са в съответствие с тези при възрастни, както и с данните от литературата.

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.

Отношението АСАТ/АЛАТ е валидирано при различни чернодробни заболявания при възрастни и отношение >1 е предиктивно за цироза.

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.

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 сигнифи-

кантна 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 AUC 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. В дисертационния труд за норма на АСАТ е прието: над 1 г. – под 40 IU/l; под 1 г. – 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 изследвани деца с вирусни хепатити с cut off за фиброза $\geq 0,5$, $\geq 0,656$ за фиброза $\geq F2$, $\geq 0,83$ за фиброза $\geq F2$, както и при трансплантирани деца на десетата година след трансплантацията cut-off $\geq 0,45$ за APRI открива значима фиброза (ISHAK score ≥ 3).

Авторски колектив от Азия съобщава за значимо по-високи стойности на FIB-4 ($0,24 \pm 0,12$ vs $0,31 \pm 0,21$, $p=0,010$) и APRI ($0,67 \pm 0,54$ vs $0,78 \pm 0,38$, $p=0,032$) при деца със сигнификантна фиброза в сравнение с лека фиброза вследствие на НАМЧБ. Други проучвания установяват, че FIB-4 не може да разграничава наличието на каквато и да е фиброза – нито сигнификантна, нито напреднала.

Получените стойности на APRI и FIB-4 при деца са значително по-ниски от тези, докладвани при възрастни. Вероятно това са дължи на възрастта. Резултатите са в съзвучие с данните от литературата.

В изследваната популация диагностична стойност на FibroTest 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 AUROC 0,90 за разграничаване на напреднала фиброза. 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. De Ledinghen et al. съобщават за AUROC 0.73 на FibroTest за разпознаване на цироза при деца с хронични чернодробни заболявания.

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 ($p=0,109$).

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 изведените проучвания. 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 статистически 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 ($p=0,788$).

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. 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 ТМ6SF2 Е167К. Намира се при 1 пациент с хомозиготно и при 1 в хетерозиготно състояние. Само 1 от контролите е хетерозиготен носител на полиморфизма. Наличието на ТМ6SF2 Е167К не се асоциира с развитие на НАМЧБ ($p=1,000$). В дисертационния си труд Карамфилова изследва освен връзката на PNPLA3 I148M и ТМ6SF2 Е167К с НАМЧБ и преддиабет. Тя установява, че 89% от изследваните пациенти с НАМЧБ са хомозиготи по нормалния алел за ТМ6SF2 и само 11% са хетерозиготни носители по патологичния ТМ6SF2 Е167К. Вероятно ТМ6SF2 Е167К се среща по-рядко в сравнение с PNPLA3 I148M и GSKR P446L в българската популация.

V. 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.

VI. 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.

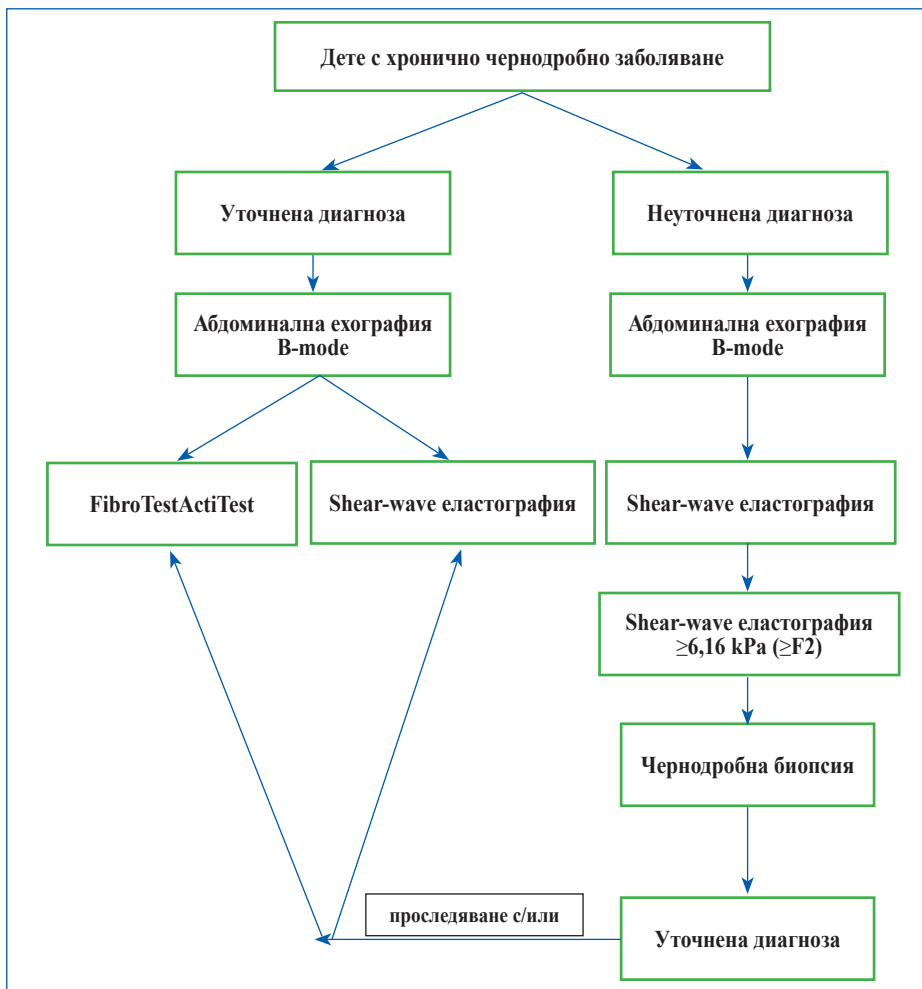
При съмнение за наличие на ХЧЗ прилагането на SSWE е подходящ първи метод на избор за определяне степента на чернодробна фиброза. Повишената плътност от SSWE, от своя страна, е в подкрепа на диагнозата ХЧЗ и може да бъде индикация за извършване на чернодробна биопсия и допълнителни изследвания при необходимост.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

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.

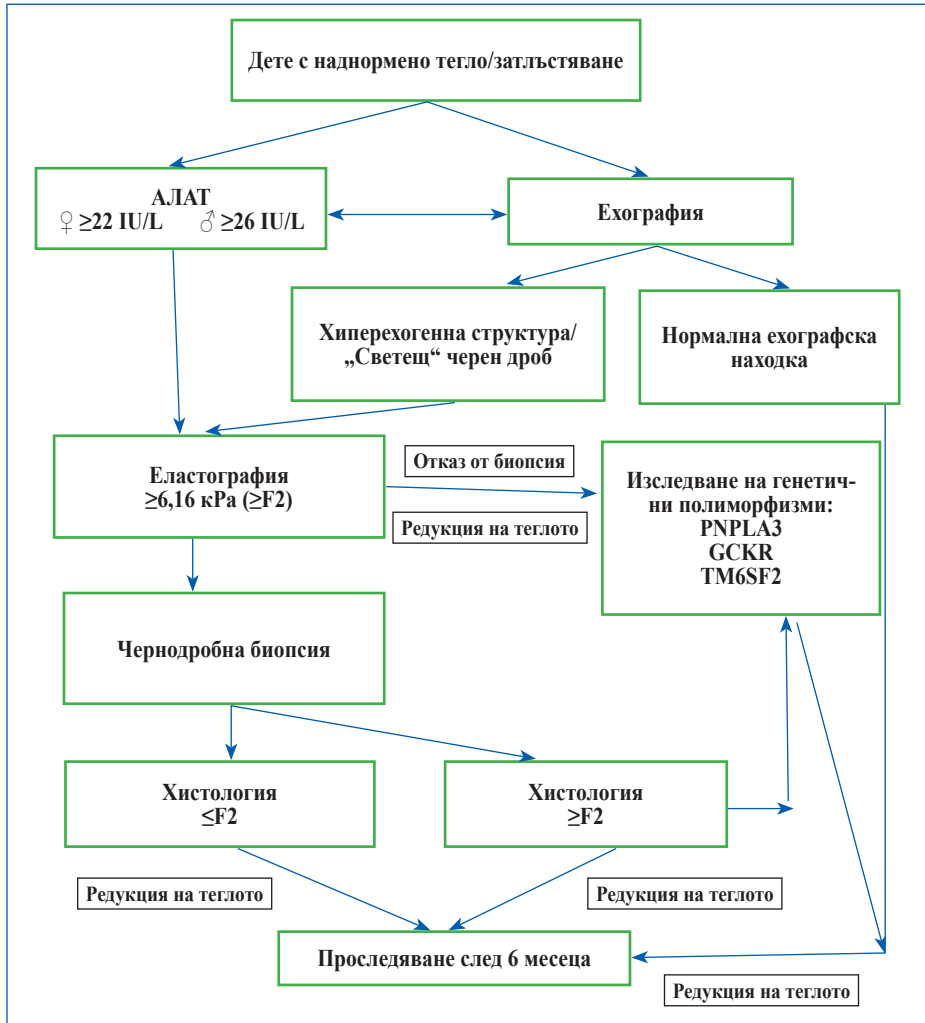
VII. АЛГОРИТМИ

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

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)



VIII. ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в страната е изследвана ролята на Shear-wave еластографията за оценка на чернодробната фиброза при педиатрични пациенти.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. За първи път в страната е изследвана ролята на генетичните полиморфизми PNPLA3 I148M, TM6SF2 E167K и GCKR P446L в развитието на НАМЧБ при педиатрични пациенти.
9. За първи път в страната е предложен алгоритъм за проследяване на педиатрични пациенти с хронични чернодробни заболявания.
10. За първи път в страната е предложен алгоритъм за проследяване на педиатрични пациенти с НАМЧБ.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е значението на Shear-wave еластографията като високочувствителен неинвазивен метод за оценка на сигнификантна и напреднала чернодробна фиброза.
2. Потвърдена е ролята на Shear-wave еластографията за определяне степента на чернодробната фиброза и проследяване на деца с ХЧЗ в ежедневната клинична практика.
3. Потвърдено е превъзходството на Shear-wave еластографията над неинвазивните кръвни маркери за фиброза при пациенти с хронични чернодробни заболявания.
4. 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.

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

Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. **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.
2. **Д. Кофинова**, Д. Авджиева-Тзавелла, Хр. Желев. Оценка на чернодробната фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст. Еластография. Педиатрия 2018; 2:10-15.
3. 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).

Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд:

1. **Д. Кофинова**. Неинвазивни методи за оценка на чернодробната фиброза. Дни на детската гастроентерология, 21–22 април 2017, Велико Търново, лекция
2. **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
3. **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
4. **Д. Кофинова**. Нарушения в обмяната на жлъчните киселини. Дни на детската гастроентерология, 23–25.03.2018, Хисаря, лекция
5. **Denitza Kofinova**, Mila Baycheva, Marlana 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

6. **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
7. **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?
8. **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
9. **Д. Кофинова**, П. Хаджийски, Д. Къосева-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, лекция

X. 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!

