

„АДЖИБАДЕМ СИТИ КЛИНИК УМБАЛ ТОКУДА“ ЕАД

КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ

Д-Р РОЗАЛИНА ИВАНОВА БАЛАБАНСКА

**ЧЕРНОДРОБНА СТЕАТОЗА И НЕАЛКОХОЛЕН СТЕАТОХЕПАТИТ -
КЛИНИЧНА ОЦЕНКА И ПРИЛОЖЕНИЕ НА ТРАНЗИЕНТНА
ЕЛАСТОГРАФИЯ (FIBROSCAN)**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И
НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

ДОКТОРСКА ПРОГРАМА „ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ“

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
ПРОФ. Д-Р СИМЕОН СТОЙНОВ, Д.М.Н.**

СОФИЯ, 2021

Дисертационният труд е написан на 145 стандартни страници и е онагледен с 59 фигури и 29 таблици. Библиографията съдържа 133 литературни източници, от които 11 на кирилица и 122 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита от разширен Научен Колегиум на Клиника по Гастроентерология към Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ Токуда.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 1 септември 2021 год. от 13 часа в Аулата на „Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ Токуда“, 9 етаж, на заседание на Научното жури в състав:

Проф. Д-р Милена Станева, д.м.

Проф. Д-р Искрен Коцев, д.м.н.

Проф. Д-р Красимир Антонов, д.м.н.

Проф. Д-р Диана Стефанова- Петрова, д.м.н.

Проф. Д-р Деян Желев, д.м.

СЪДЪРЖАНИЕ:

Използвани съкращения.....	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. МЕТОДИКА НА ПРОУЧВАНЕТО.....	8
1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	8
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	9
III. РЕЗУЛТАТИ.....	18
1. Демографски и клинични характеристики на пациентите.....	18
2. Статистически анализ.....	49
IV. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....	72
V. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ.....	86
VI. ПРИНОСИ.....	88
VII. ПУБЛИКАЦИИ, свързани с дисертационния труд.....	89

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

АЛАТ- аланин аминотрансфераза

АСАТ- аспартат аминотрансфераза

ГГТ- гамаглутамил трансептидаза

ЗД – захарен диабет

МетС - метаболитен синдром

НГТ - нарушен глюкозен толеранс

НАСХ - неалкохолен стеатохепатит

ОГТТ - орален глюкозо-толерантен тест

На латиница

AASLD - Американска асоциация за изучаване на черния дроб

AFLD - алкохолна стеатозна чернодробна болест

APRI - aspartate aminotransferase to Platelets ratio index

BMI - Body mass index (индекс на телесна маса)

CAP - controlled attenuation parameter

EASL - европейска асоциация за изучаване на черния дроб

EFSUMB - европейска федерация по ултразвук в медицината и биологията

ELF- enhanced Liver fibrosis

FAST score - Fibroscan- AST

FIB-4 - Fibrosis - 4 Index for liver fibrosis

GGT - gamma - glutamyl transpeptidase

GLP-1- глюкагоноподобен пептид-1

HbA_{1c} - гликиран хемоглобин

HCC - хепатоцелуларен карцином

HDL (high-density lipoprotein) - холестерол в липопротеините с висока плътност

HOMA-IR - Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance

hs CRP - високочувствителен С-реактивен протеин

LMS - Liver multiScan

LSM - liver stiffness measurement

MAFLD - metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease

MFS - Modified Fatty score

MRI - Магнитно-резонансно изследване

MRS - MR spectroscopy-магнитнорезонансна спектроскопия

NAFLD - nonalcoholic fatty liver disease (неалкохолна стеатозна чернодробна болест)

NASH - nonalcoholic steatohepatitis (НАСХ-неалкохолен стеатохепатит)

NFS - NAFLD fibrosis score

PDFF MRI - MRI-derived proton density fat fraction technique

TE - transient elastography-транзиентна еластография

US – FLI - Ultrasound Fatty liver index

VCTE (Fibroscan) - vibration controlled transient elastography- вибрационно контролирана транзиентна еластография

VLDL - холестерол в липопротеините с много ниска плътност

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Чернодробната стеатоза се характеризира с натрупване на мазнини под формата на триглицериди в цитоплазмата на чернодробните клетки, като мазнините надхвърлят 5% от теглото му или при хистологично изследване повече от 5% от хепатоцитите са изпълнени с мастни капки.

Често като синоними на чернодробната стеатоза се използват понятията мастна инфилтрация, мастна дегенерация, мастна дистрофия или затлъстяване на черния дроб.

През последните години честотата на чернодробната стеатоза се увеличава, което се свързва с нарастващата честота на затлъстяването, на захарния диабет и повишената консумация на алкохол.

Различават се най-общо два вида чернодробна стеатоза - неалкохолна стеатозна чернодробна болест (NAFLD) и алкохолна чернодробна болест (AFLD).

Чернодробната стеатоза е чернодробната изява на метаболитния синдром, включващ централно затлъстяване, инсулинова резистентност, хиперлипидемия, хипергликемия и артериална хипертония. NAFLD се установява при 70% от хората с наднормено тегло или затлъстяване, при 90% от тези с болестно затлъстяване, при 70% от диабетичите. С чернодробна стеатоза са 25-30 % от населението по света. Налице е световна пандемия от затлъстяване и чернодробна стеатоза и NAFLD се превръща в най-честата хронична чернодробна болест по света.

Неалкохолната стеатозна чернодробна болест (NAFLD) се определя като спектър от чернодробни нарушения и варира от обикновена стеатоза (NAFL) до стеатохепатит (NASH) с или без фиброза. Когато на фона на стеатозата се появи и възпаление се развива стеатохепатит, а прогресията на чернодробната фиброза може да доведе до развитие на цироза и хепатоцелуларен рак.

В зависимост от големината на капките в хепатоцитите се различават три типа стеатоза: дребнокапчеста, средно и едрокапчеста стеатоза. А според процента хепатоцити, изпълнени с липиди, се определят следните степени на стеатозата: 0 – здрави (под 5% от хепатоцитите), степен 1- лека, засяга 5-33 %, 2- умерена, съответно 34-66%, 3- тежка - над 66% от хепатоцитите.

Диагнозата се базира на медицинската история, кръвни изследвания, образни методи и чернодробна биопсия, която все още е златен стандарт за комплексна оценка на заболяването. Ограниченията, свързани с

чернодробната биопсия (инвазивност, риск от усложнения с кървене, грешки на пробите, вариабилност на оценката от различни експерти, затруднения за динамично проследяване на фиброзата) мотивират търсенето на неинвазивни алтернативи за оценка на състоянието на черния дроб при пациенти с NAFLD. Използват се различни методи: серумни маркери, образни техники (ехография, СТ, MRI и транзиентна еластография) за неинвазивна оценка на чернодробната стеатоза и фиброза. Очаква се те да изместят напълно необходимостта от извършване на чернодробна биопсия.

Физикалният преглед включва антропометрични показатели: измерване на ръст, телесно тегло, определяне на индекс на телесна маса (BMI), степен на затлъстяване, коремна обиколка, сърдечен и коремен статус, палпация на черен дроб и слезка. Назначават се пълни лабораторни изследвания, ехография на коремни органи, транзиентна еластография. Стеатозата се долавя ехографски, когато акумулирането на мазнини е в над 15-20% от чернодробния паренхим. Хиперехогенността, т.нар. „светъл“ черен дроб, се дължи на високо рефлектиращ интерфейс поради повишеното интрацелуларно мастно натрупване.

Транзиентната еластография, известна с брандираното име FibroScan, е вид shear wave еластография, неинвазивен метод за количествена оценка на чернодробната плътност, отговаряща на фиброзата и едновременно измерване на стеатозата чрез контролиран атенюиран параметър (CAP), базиран на ултразвуковата атенюация в dB/m при честота 3,5 MHz.

Чернодробната стеатоза е обратим процес при отстраняване на причината. Това налага своевременно откриване с бързи, достъпни неинвазивни методи и предприемане на действия за овладяването ѝ.

II. МЕТОДИКА НА ПРОУЧВАНЕТО

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО

ЦЕЛТА на проучването е да се анализират неинвазивните методи за оценка на чернодробна стеатоза и неалкохолен стеатохепатит и да се изработи клиничен алгоритъм за изследване на черния дроб при пациенти с метаболитен синдром, затлъстяване, 3Д или повишени чернодробни ензими.

ЗАДАЧИ

За постигането на тази цел е необходимо да се изпълнят следните **задачи**:

1. Да се анализират резултатите от измерване на стеатозата с CAP (Controlled attenuation parameter) на Фиброскан при пациенти с метаболитен синдром и се сравнят с хистологичната находка от чернодробна биопсия.

2. Да се определят cut-off стойности на CAP с Фиброскан за различните степени на стеатоза: C1 – 5-33 %, C2 – 33-66%, C3 – над 66% мастно натрупване в черния дроб.

3. Да се прецизира стадирането на фиброзата с транзитната еластография и се сравни с резултатите от хистологичното изследване на черния дроб.

4. Да се анализира корелацията между BMI и чернодробната стеатоза, както и между обиколката на талията (като показател за висцерално затлъстяване) и оценката на стеатоза с CAP от Фиброскан и хистологичния резултат.

5. Да се прецизира ехографското изследване на черния дроб с полуколичествена оценка на тежестта на стеатозата и се въведат индекси US-FLI, MFS.

6. Да се анализират лабораторните тестове за оценка на чернодробна стеатоза и индексите за активност и фиброза.

7. Да се определят неинвазивни методи и маркери за разграничаване на обикновената стеатоза от неалкохолния стеатохепатит.

8. Да се анализират резултатите от LMS (Liver MultiScan)-магнитнорезонансна спектроскопия и се сравнят с показанията от транзитната еластография с Фиброскан

9. Да се изработи алгоритъм за изследване състоянието на черния дроб при пациенти с метаболитен синдром.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

От набавянето на апарата Фиброскан 502 в клиниката по гастроентерология на Токуда болница през 8.2013 год. до 3.2020 год. са извършени общо 4890 изследвания на чернодробна плътност. Осигуряването през 12.2016 год. на софтуерна програма за измерване на количеството отложени мазнини в черния дроб на принципа на атенюирането на ултразвук създаде възможност за едновременно измерване както на плътността на черния дроб, насочваща към степента на фиброза, така и количествено определяне на чернодробната стеатоза. За периода от 12.2016 год. до 03.2020 год. в клиниката са изследвани чрез транзиентна еластография с апарат Фиброскан общо 3560 пациента като на всички е измерена едновременно както плътността така и степента на стеатоза. Този апарат е първият доставен в България и в продължение на последните 7 години остана единствен за страната като даде възможност на нашия екип да добие значителен опит и се утвърдим като пионери в методиката.

Проучената група включва 170 пациента с метаболитен синдром за периода от 12.2016 год. до 3.2020 година. Те са изследвани с Фиброскан – сонда М или XL за транзиентна еластография с едновременно измерване на плътност и чернодробна стеатоза. При 135 от тях е извършена чернодробна биопсия за хистологична оценка в патоанатомичната лаборатория на Токуда болница. Хистологично е определена степента на стеатоза, възпалителна активност и фиброза с използване на SAF скорова система, оценка на фиброзата по Metavir и Kleiner.

В деня на чернодробната биопсия при всички болни е извършена транзиентна еластография с апарат Фиброскан като е измерена едновременно чернодробната плътност в кРа, съответна на степента на фиброзата и количеството на отложените мазнини за степента на стеатозата. Използван е апарат Фиброскан 502 Touch, на фирма Ехосенс, Франция, device number F 60271, с две сонди – М и XL.

На 20 болни е извършен Liver Multiscan – магнитнорезонансна спектроскопия с определяне на количеството на мазнините в черния дроб, съдържанието на желязо, определен е LIF score за степен на прогресия на чернодробното увреждане.

За оценка на пациентите са използвани следните методи:

1. Клинични изследвания

Включват подробна **анамнеза и обективен физикален статус**.

На пациентите е снета подробна анамнеза за субективни оплаквания, придружаващи заболявания и вредни навици. Включени са само пациенти, които отговарят на условията да нямат прекомерна употреба на алкохол, според стандарта до 20 г чист алкохол при жените и до 30 г чист алкохол при мъжете за денонощие. Уточнено е наличието на артериална хипертония, дислипидемия, захарен диабет, фамилна обремененост за метаболитни нарушения.

Извършен е пълен физикален преглед с антропометрични показатели-измерено е телесното тегло и ръста, коремната обиколка – талия в см, изчислен е индексът на телесна маса (BMI).

$$\text{BMI} = \text{телесна маса (kg)} / \text{ръст (m)}^2$$

BMI (Body mass index) представлява отношение на телесното тегло (kg) спрямо ръста (m)² и добре корелира с количеството мастна тъкан в тялото. Основен недостатък е, че не оценява разпределението на мастната тъкан (централно спрямо периферно и подкожно спрямо висцерално).

От 1998 г. СЗО въвежда BMI и понастоящем той е широко възприет метод за дефиниция и класифициране на телесната маса при лица над 18 години, като стойностите са възрастово-независими и еднакви за двата пола. В практиката се придържахме към класификацията на Международната група по проблемите на затлъстяването (IOTF) за наднормено тегло при BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ и затлъстяване при BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ за Европейската раса.

Таблица 1. Класификация на телесното тегло, съобразно BMI и асоциацията му с болестността и смъртността (СЗО 2000).

BMI (kg/m ²)	Класификация	Здравен риск
< 18.5	Поднормено	Повишен
18.5–24.9	Нормално тегло	Неповишен
25.0–29.9	Наднормено тегло	Повишен
30.0–34.9	I степен затлъстяване	Умерено повишен
35.0–39.9	II степен затлъстяване	Силно повишен
≥ 40.0	III степен затлъстяване	Много силно повишен

Американската Кардиологична Асоциация препоръчва използването на допълнителни подгрупи при пациентите с високостепенно затлъстяване: степен IV - кореспондираща на $BMI \geq 50 \text{ kg/m}^2$ и степен V – на $BMI \geq 60 \text{ kg/m}^2$. По-ниски граници за BMI се препоръчват за популациите от Южна Азия, Китай и Япония, където наднормено тегло се приема при $BMI \geq 23 \text{ kg/m}^2$ и затлъстяване при $BMI \geq 27.5 \text{ kg/m}^2$ (C3O, 2000).

Обиколка на талията – измерва се по средната хоризонтална линия между долния ръб на ребрената дъга (долната граница на 10-то ребро) и горния ръб на илиачната кост, в края на нормално спокойно издишване. (C3O, 2008).

Натрупването на интраабдоминална (висцерална) мастна тъкан се свързва с по-големи метаболитни и сърдечно-съдови последици отколкото общото затлъстяване. Обиколката на талията е добър антропометричен предиктор за висцерално мастно натрупване. Тя е полово и етнически стратифицирана и съобразно IDF (2005) горната граница над която се приема **абдоминално затлъстяване** при европейската раса е **94 cm за мъжете и 80 cm за жените**. За азиатската популация тези граници са $\geq 90 \text{ cm}$ за мъжете и $\geq 80 \text{ cm}$ за жените.

C3O дефинира **две нива на абдоминално затлъстяване** в зависимост от риска за метаболитни усложнения. Мъжете с обиколка на талията $\geq 94 \text{ cm}$ и жените $\geq 80 \text{ cm}$ от европейската раса имат повишен риск от свързани със затлъстяването здравни проблеми, но рискът е значително повишен при стойности **$\geq 102 \text{ cm}$ при мъже и $\geq 88 \text{ cm}$ при жени** (NICE, 2016; IDF, 2005).

Свързаният със затлъстяването риск се оценява по-точно, когато се комбинират данните от BMI и обиколката на талията (C3O 2000). Увеличената обиколка на талията може да предскаже повишен здравен риск, дори когато BMI е в границите на нормата (EASO, 2014).

Отношение талия/ханш - C3O възприема за нормални стойности под 0.85 за жени и под 0.9 за мъже.

По препоръка на C3O след антропометричната оценка на наднорменото тегло и затлъстяването, лицата с $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ и/или обиколка на талията $\geq 80 \text{ cm}$ при жените и $\geq 94 \text{ cm}$ при мъжете (за Европейската раса) трябва да бъдат насочено изследвани клинично за подлежащите причини и придружаващите усложнения, свързани със затлъстяването. Това засили нашето внимание именно към тази група пациенти с наднормено тегло и затлъстяване за прецизна оценка на

състоянието на черния дроб, липидната и въглехидратна обмяна и сърдечно-съдовия риск.

2. Лабораторни изследвания

В деня на прегледа е взета кръв на гладно (поне 8 часа след последното хранене) за лабораторни изследвания, които са направени в клиничната лаборатория на Токуда болница, а някои по-специфични изследвания – в лаборатория Ison (европейски клон в Дъблин, Ирландия).

Освен чернодробните ензими – АСАТ, АЛАТ, ГГТ, АФ са изследвани липиди, пикочна киселина, кръвна захар, HbA1c, серумно желязо, феритин, трансферин, високочувствителен С-реактивен протеин, кръвна картина с анализ на броя на тромбоцитите. Уточнени са критериите за приемане на метаболитен синдром, инсулинова резистентност, нарушен глюкозен толеранс и захарен диабет. При всички пациенти е измерен FIB-4 като неинвазивен индекс за оценка на фиброзата.

Възприели сме дефиницията за **Метаболитен синдром**, като комбинация от 3 или повече от следните 5 критерия:

- (1) Увеличена обиколка на талията, > 80 см за жени и > 94 см за мъже;
- (2) Хипертриглицеридемия – повишени серумни триглицериди $> 1,7$ mmol/l или специфично лечение на това липидно нарушение
- (3) Понижени стойности на HDL-холестерол в серума $< 1,0$ mmol/l при мъже и < 1.3 mmol/l при жени или специфично лечение на това липидно нарушение
- (4) Артериална хипертония – Повишено систолно артериално налягане (САН) ≥ 130 или диастолно (ДАН) ≥ 85 mmHg или лечение на вече диагностицирана хипертония
- (5) Повишена серумна глюкоза на гладно $\geq 5,6$ mmol/l или вече диагностициран ЗД тип 2.

При всички пациенти, включени в проучването е изследвана въглехидратната обмяна и е уточнено наличието на инсулинова резистентност и дали покриват критериите за метаболитен синдром.

Както е известно **HOMA-IR** при недиабетни лица се дефинира като произведение на глюкоза на гладно в mmol/l и инсулин в mU/ml, разделено на 22,5.

Формула: $HOMA-IR = \text{глюкоза} \times \text{инсулин} / 22,5$

Интерпретацията на резултатите се базира на следните референтни стойности: нормален HOMA-IR <2,5; рискова зона 2,5 - 5,0; висока инсулинова резистентност >5,0.

При оценка на нарушението на въглехидратната обмяна сме се съобразили с възприетите ясни дефиниции, а именно:

- **За повишена глюкоза на гладно (IFG)**, означавана като **нарушена гликемия на гладно** се приемат нива 5,5-6,94 mmol/l.
- **Нарушен глюкозен толеранс**: 7,8 – 11,0 mmol/l на 2-ри час при ОГТТ. Незадължително HbA1c: 5,7 – 6,4 %
- **Захарен диабет тип 2** се дефинира като: ниво на плазмена глюкоза на гладно

(FPG) ≥ 7.0 mmol/l или на втория час от ОГТТ ≥ 11.1 mmol/l, или случайна плазмена глюкоза ≥ 11.1 . Незадължително: HbA1c $\geq 6,5\%$.

Чрез ОГТТ се отдиференцират нарушенията във въглехидратната обмяна: предиабет (нарушена гликемия на гладно и нарушен глюкозен толеранс) и захарен диабет, от нормалното здраво състояние.

Таблица 2. Класификация на нарушенията на въглехидратната обмяна по IDF, 2015.

	Глюкоза на гладно (mmol/l)	На 2ч. при ОГТТ (mmol/l)	HbA1c (%)
Норма	< 6.1	< 7.8	< 5.7
Нарушена гликемия на гладно	6.1 – 6.9		5.7 - 6.4
Нарушен глюкозен толеранс		7.8 – 11.0	
Захарен диабет	≥ 7.0	≥ 11.1	≥ 6.5

Някои лабораторни показатели са включени в изчислението на скорове за оценка на фиброза или наличие на NASH - като FIB-4, NFS (NAFLD fibrosis score) и FAST score, които сме определили при изследваните в проучването пациенти.

FIB-4

FIB-4 е неинвазивна скорова система, базирана на лабораторни тестове за оценка на степента на фиброза на черния дроб. Този скор се използва за

оценка на чернодробното увреждане причинено от хепатит С или при NASH (неалкохолен стеатохепатит). Създаден е от Richard Sterling през 2006 г. Включени са 4 показателя: възраст, стойност на ACAT, АЛТ и тромбоцити.

Формула на FIB-4:

$$\text{FIB-4 score} = (\text{Age} \times \text{AST}) / (\text{Platelets} \times \sqrt{\text{ALT}})$$

Таблица 3. FIB-4. Базирано на Ischak fibrosis staging (Sterling et al 2006)

FIB-4 score	Ischak Fibrosis staging
< 1,45	0-1
1,45-3,25	2-3
>3,25	4-6

Линкът за достъп до он-лайн автоматичен калкулатор на FIB-4 е: <https://www.hepatitisc.uw.edu/page/clinical-calculators/fib-4>

Скорът е толкова по-висок колкото по-голяма е възрастта и нивото на ACAT и колкото по-ниски са тромбоцитите. Стойности под 1,45 са приемливи и съответстват на липса или съвсем лека начална фиброза (F0-1/), докато над 3,25 са критерий за напреднала фиброза (4-6 бала по Ischak или F3-F4 по Метавир). През 2017 год. Mc Pherson приравнява този скор към Метавир (0-4). FIB-4 има отлична негативна предиктивна стойност да се изключи напреднала фиброза. При възраст под 35 години и над 65 години дава по-малко надеждни резултати и това трябва да се има предвид при интерпретацията на резултатите.

При всички изследвани пациенти е изчислен FIB-4 и резултатът е сравнен с хистологичната находка за фиброза и измерването на плътността на черния дроб с транзиентна еластография (Fibroscan).

NAFLD Fibrosis score

NAFLD Fibrosis score (NFS) е създаден от Paul Angulo от Mayo clinic, Саш. Изработен е online калкулатор с въвеждане на възраст, BMI, ACAT, АЛТ, тромбоцити, албумин и информация дали има ЗД или IFG (нарушена кръвна захар на гладно). Стойност < -1,455 показва липса на сигнификантна фиброза (F0-F2), от -1,455 до 0,675 - умерена фиброза, и стойности > 0,675 - сигнификантна фиброза (F3-F4).

FAST score (Fibroscan- AST)

FAST score включва три показателя:

- CAP за стеатоза, в dB/m
- измерване на плътност (Stiffness) в kPa,
- ACAT – в IU/мл

Измерва се автоматично чрез он-лайн програма. Варира от 0 до 1, като съответно: до 0,35 – няма NASH, от 0,35 до 0,67 – показва вероятен NASH, над 0,67 – потвърждава NASH с налична активност (NASH с $NAS \geq 4$, $F \geq 2$).

3. Ехография на коремни органи

При всички пациенти е извършено стандартно ехографско изследване на коремните органи с ултразвуков апарат General electric Pro 7 и Logic 5 като са използвани следните ехографски критерии за чернодробна стеатоза:

- Лека степен (1) - дифузно повишена ехогенност на чернодробния паренхим с добра видимост на диафрагмата, интрахепаталните съдове и стената на жлъчния мехур
- Умерена степен (2) - умерено повишена ехогенност на чернодробния паренхим с леко намалена видимост на диафрагмата, интрахепаталните съдове и стената на жлъчния мехур
- Тежка степен (3) - значително повишена ехогенност на чернодробния паренхим и силно намалена или липсваща видимост на диафрагмата, интрахепаталните съдове и стената на жлъчния мехур.

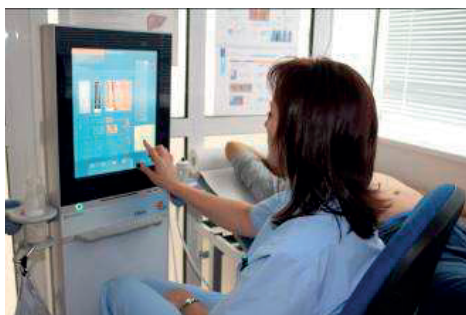
Използван е US-FLI (Ultrasound fatty liver index) и MFS (Modified fatty score), както и оценка за нехомогенна петниста структура с наличие на огнищна стеатоза (focal fatty changes) и зони лишени от стеатоза (focal sparing). Определен е скор на Zardi (включващ атенюация на ултразвука, наличие на focal sparing и увеличен надлъжен размер на слезката) за отдиференциране на простата стеатоза от NASH.

4. Транзиентна еластография

Използван е апарат FibroScan 502 Touch, device number F 60271, с две сонди-М и XL, съответно със серийни номера S70862 и S90306, производител Ехосенс, Франция, със софтуер за CAP (Controlled attenuation parameter), software version 3.1.0.0., дата на производство на апарата 12 март 2013 г, инсталиран в клиниката през 08.2013 година.

В деня на чернодробната биопсия е извършено предварително изследване с апарат Фиброскан съгласно изискванията на гладно, като поне 2 часа преди това пациентите не са приемали храна. На всички пациенти с транзитна еластография е измерена едновременно плътността (stiffness) в кРа, отговаряща на фиброзата и CAP в dB/m за количествена оценка на стеатозата на черния дроб.

Оценка на степента на фиброзата от 0 до 4 е извършена според приетите cut-off стойности (след метаанализи при пациенти с NAFLD и NASH): норма до 5-5,5 кРа, степен F1 – до 7 кРа, степен F2 – 7,5 до 10 кРа, степен F3 – 10 до 14 кРа, степен F4 >14 кРа.



Фигура 13. Апарат FibroScan 502, Echosens, France. Гастроентерологична клиника, Токуда болница

За CAP е използван следният cut-off за различните степени: S0 – до 233 dB/m, S1 – 233-270 dB/m, S2 – 270-300 dB/m, S3 – 300-400 dB/m.

5. Чернодробна биопсия

За периода от 12.2016 до 3.2020 г. при 135 пациента с метаболитен синдром е извършена чернодробна биопсия в клиниката по гастроентерология на Токуда болница- с игла Хепафикс 1,2 мм, 18G, аспирационна биопсия по метода на Менгини или true cut с игла 16 G или 18 G под ехографски контрол. При всички пациенти е осъществена прецизна хистологична оценка в патоанатомичната лаборатория на Токуда болница.

Оценена е стеатозата - наличие на едрокапчеста, среднокапчеста или дребнокапчеста (микровезикуларна) стеатоза и в какъв процент от чернодробните клетки се установява. Съответно, засягане под 5% от хепатоцитите се приема за нормална находка, от 5 до 33% – за стеатоза първа (лека) степен (S1), при засягане на 33 до 66% от чернодробните клетки – за втора (умерена) степен (S2) и при засягане над 2/3 от чернодробното делче (когато над 66% от хепатоцитите са с мастни капки) – за трета (тежка) степен на стеатоза (S3). Хистологично е преценена и чернодробната фиброза – наличието на фиброзни септи, възпалителната активност според инфилтрацията от левкоцити, наличието на мрежеста (балонна) дегенерация с т.нар. балониране на хепатоцитите, което се явява визитна картичка за стеатохепатит, ацидофилни телца или телца на Малори Денк, % на гликогенизация на ядрата на чернодробните клетки.

На 99 пациента хистологичен материал – парафиново блокче или готови неоцветени препарати са изпратени за допълнителна независима експертна оценка от водещи специалисти с определяне на SAF и NAS скор. При 60 пациента разчитането е направено от водещ патоанатом Pierre Bedossa, професор в Department of Pathology, Hôpital Beaujon, University Paris-Denis Diderot, Франция, а при 39 в Америка с участието на Проф.Скот Фридман във връзка с участие в международна клинична програма за изследване и лечение на пациенти с неалкохолен стеатохепатит.

6. Ядрен магнитен резонанс- Liver MultiScan

На 20 болни е извършен Liver Multiscan – магнитнорезонансна спектроскопия в Медицински център Неоклиник с апарат Phillips Medical Systems, Software version 5.3.1/5.3.1.1, с количествена оценка на натрупаните мазнини в черния дроб, изразени в проценти, изчисление на LIF score за степен на прогресия на чернодробното увреждане и е измерено съдържанието на желязо в чернодробната тъкан.

7. Статистически методи

Статистическият анализ на данните е осъществен чрез следните програми: STATISTICA (version 13.0, StatSoft Inc., Copyright 1991-2015) и STATA (version 16.1, StataCorp LLC, Copyright 1985-2019). Количествените променливи са изчислени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение. За тях са описани също така минимална и максимална стойност, медиана,

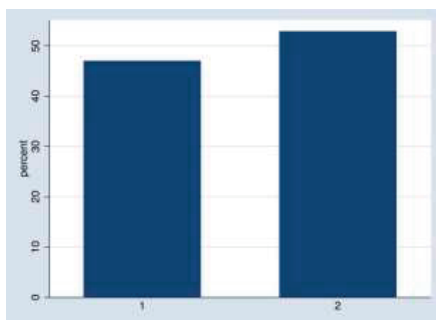
коэффициент на асиметрия (skewness) и коэффициент на ексцес (kurtosis). Категорийните променливи са изразени като брой и проценти. Честотните разпределения по възраст, пол и вид на изследваните показатели са представени в табличен и графичен вид според данните от дескриптивен статистически анализ. Сравнителен междугрупов анализ е извършен чрез непараметричния тест на Kruskal-Wallis по рангове, който е последван от допълнителен (post hoc) анализ чрез теста на Dunn и използване на Bonferroni корекция. Данните са подложени на допълнителен корелационен анализ чрез хи-квадрат тест (Chi-square test) и представени чрез корелационен коефициент на Pearson. Корелацията между категориите променливи (дихотомни и номинални) е изчислена чрез ранговата корелация на Спирман (Spearman) и представена чрез P_o (ρ) коефициент. Методът на LASSO е използван за избор на клинични, лабораторни и/или процедурни фактори, които се включват в диагностичен модел за неинвазивно определяне на чернодробна стеатоза и фиброза чрез транзиентна еластография. Р-стойност под 0.05 е приета за статистически значима.

III. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

1. Демографски и клинични характеристики на пациентите

1.1. Пол и възраст

В проучването са включени 170 пациенти с метаболитен синдром и чернодробна стеатоза, както следва: 90 жени (52.9%) и 80 мъже (47.1%).



Фигура 14. Разпределение (в %) на изследваната група болни по пол (1=мъжки пол, 2=женски пол)



Фигура 15. Разпределение (в брой и %) по пол и възрастови групи.

Средната възраст за цялата група изследвани пациенти е $50,91 \pm 11,36$ години (от 20 до 76 г., медиана – 51 г.). За мъжете средната възраст е $49,13 \pm 9,52$ г. (30 до 74 г.), а за жените $52,49 \pm 12,62$ г. (20 до 76 г.).

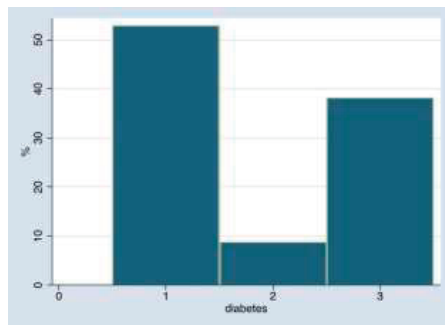
Метаболитен синдром и чернодробна стеатоза са установени най-често във възрастта между 40 и 70 години както при мъжете, така и при представителите на женския пол.

1.2. Метаболитно нарушение

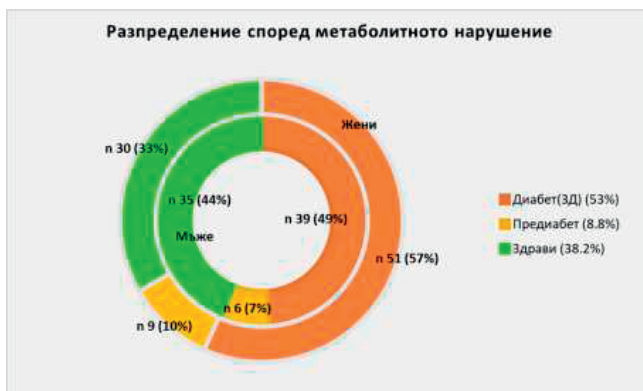
При 90 от 170 пациенти (52,9%) е установен ЗД тип 2 като разпределението по пол е както следва: 39 мъже и 51 жени.

С нарушен глюкозен толеранс са 14 пациенти (8,2%), 5 мъже и 9 жени, а с повишена кръвна захар на гладно е 1 пациент от мъжки пол (0,6%). Тези пациенти са обединени в една група – предиабет (15 пациенти, 8,8%, 6 мъже и 9 жени). При 65 от 170 пациенти (38,2%, 35 мъже и 30 жени) не са открити данни за ЗД или предиабет.

НОМА-IR е определен при 63 болни, със средна стойност 6,02, SD 6,57, Min. 1,09, Max. 37, като 52 са със стойност $>2,5$, а 20 пациенти >5 . HbA1c е измерен при 155 пациенти със средна стойност 6,37, SD 1,38, Min. 4,7, Max. 12,1.



Фигура 16. Разпределение (%) на болните според метаболитното нарушение (1=захарен диабет, 2=предиабет, 3=болни без захарен диабет)



Фигура 17. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според метаболитното нарушение

1.3. Степен на затлъстяване и ВМІ

Средната стойност на показателя ВМІ за цялата група е $35,29 \pm 7,01$, съответно $35,86 \pm 7,01$ за мъжете и $34,79 \pm 7,01$ за жените.

С нормално телесно тегло (ВМІ 18,5 – 24,9) са 2 от 170 пациенти (1,2%, 1 мъж и 1 жена), а с наднормено тегло или затлъстяване (ВМІ >25) са 168 пациенти (98,8%). При 37 от 170 болни (21,8%, 17 мъже и 20 жени) е установено наднормено тегло (ВМІ от 25 до 29,9), а със затлъстяване (ВМІ

над 30) са 131 от 170 болни (77%, 62 мъже и 69 жени). Степените на затлъстяване са разпределени в групата болни по следния начин:

➤ първа степен затлъстяване (BMI 30 – 34,9): 52 от 170 болни (30,6%, 23 мъже и 29 жени).

➤ втора степен затлъстяване (BMI 35 – 39,9): 40 от 170 болни (23,5%, 17 мъже и 23 жени).

➤ трета степен затлъстяване (BMI ≥ 40): 39 души (22,9%, 22 мъже и 17 жени). В тази група се установяват 2 подгрупи. BMI е със стойности от 40 до 44,9 при 29 от 170 пациенти (17%, 16 мъже и 13 жени), а с екстремно затлъстяване (BMI над 45) са 10 болни (5,9%, 6 мъже и 4 жени). Максимален BMI = 75,5 е установен при жена на 34 години с телесно тегло 154,6 кг.



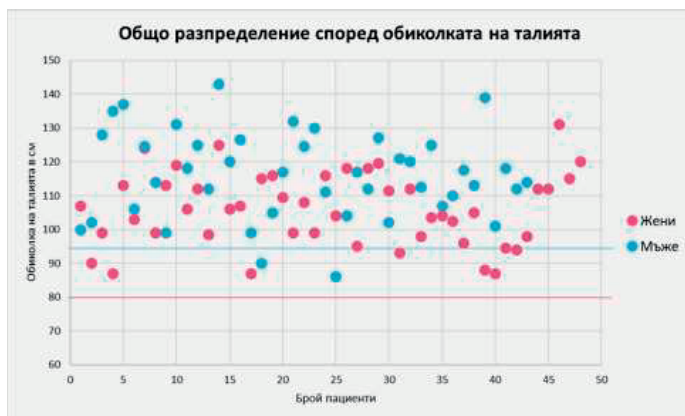
Фигура 18. Разпределение (в брой и%) според BMI при мъжете



Фигура 19. Разпределение (в брой и %) според BMI при жените

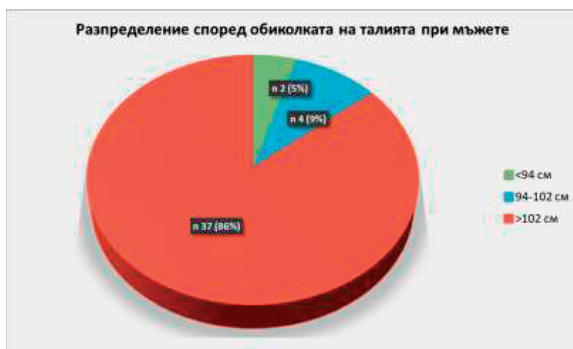
1.4. Обиколка на талията

Един от определящите критерии за наличие на метаболитен синдром е обиколка на талията над 80 см при жените и над 94 см при мъжете. Тя показва наличието на централно висцерално затлъстяване.



Фигура 20. Разпределение на болните според обиколката на талията (в см).

Обиколка на талията е измерена при 91 пациенти (43 мъже и 48 жени) в настоящото проучване. Средната обиколка на талията за цялата група е $110,7 \pm 12,86$ см (с минимална стойност 86 см и максимална 143 см). При мъжете измерената средна стойност на обиколката на талията е 116 ± 13 см (86 – 143), а при жените $106 \pm 10,86$ см (87 – 131).

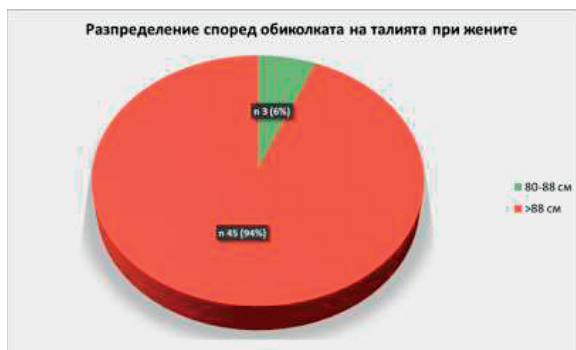


Фигура 21. Разпределение на болните (в брой и %) според обиколката на талията (при мъжете)

Обиколката на талията е измерена при 48 жени и при всички тя е над 80 см. При 41 от 43 мъже талията е над 94 см, и само при двама е под 94 см.

Съобразихме се с дефиницията на СЗО за две нива на абдоминално затлъстяване в зависимост от риска за метаболитни усложнения. Както е известно, мъжете с обиколка на талията ≥ 94 см и жените ≥ 80 см от европейската раса имат повишен риск от свързани със затлъстяването здравни проблеми, но рискът е значително повишен при стойности ≥ 102 см при мъже и ≥ 88 см при жени (NICE, 2016; IDF, 2005).

При изследваните болни със значително повишен здравен риск - талия над 102 см са 37 мъже (86%), и сред жените с талия над 88 см са 45 (93,8%). Съответно, талия под 102 см е измерена при 6 мъже (14%), а талия под 88 см е установена при 3 жени (6,2%).



Фигура 22. Разпределение на болните (в брой и %) според обиколката на талията (при жените)

1.5. Телесно тегло и ръст

Измереното средно телесно тегло за цялата група е $100,3 \pm 23,1$ кг (минимално 58 кг и максимално 198 кг). Измерената средна стойност на телесното тегло при мъжете е $111,3 \pm 23,7$ кг (71,3 – 198 кг), а за жените е $90,6 \pm 17,6$ кг (58 – 154,6).

Средният ръст при мъжете е $176 \pm 5,76$ см, а при жените е $162 \pm 6,75$ см.

1.6. Артериална хипертония

По-голямата част от болните (126 от 170; 74.1%, 59 мъже и 67 жени) са с данни за артериална хипертония, а без анамнеза и регистрирана артериална хипертония са общо 44 болни (25.9%, 21 мъже и 23 жени).



Фигура 23. Разпределение на болните (в брой и %) според наличието на артериална хипертония

1.7. Тютюнопушене

Делът на пушачите (настоящи и бивши) е 51.8% (88 от 170 болни), съответно 61,3% от мъжете и 43,3 % от жените. Бившите пушачи са с отказ от тютюнопушене за срок, който е по-дълъг от 1 година. При 82 от 170 болни (48,2%) не са открити анамнестични данни за предшестваща употреба на цигари.

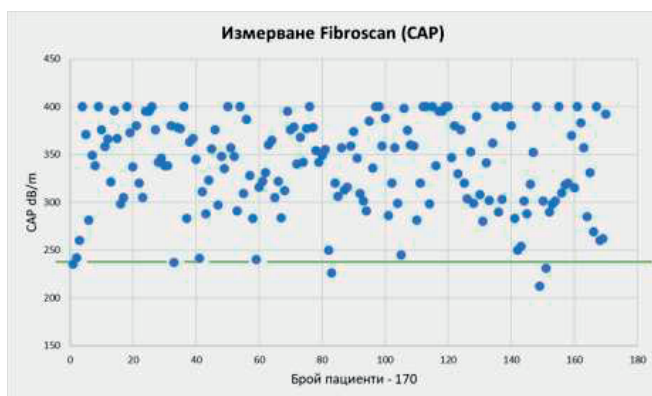


Фигура 24. Разпределение на болните (в брой, проценти и по пол) според вреден навик тютюнопушене

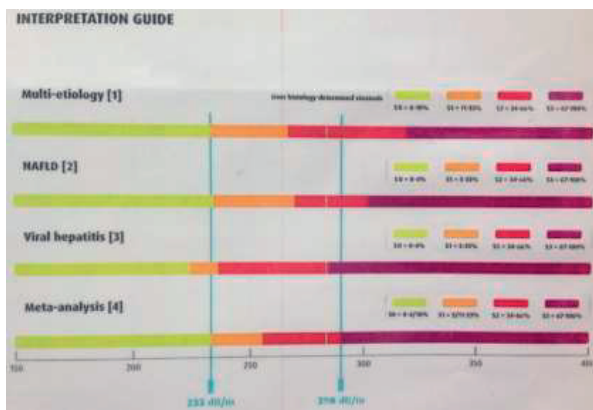
По отношение на тютюнопушенето, разпределението по пол е следното: при мъжете непущачи са 31, пушачи – 22, бивши пушачи – 27, при жените непущачи са 51, пушачи – 27, бивши пушачи – 12.

1.8. Степен на стеатозата, определена чрез CAP на Фиброскан

Всички пациенти от проучваната група (N=170) са изследвани с Фиброскан. Измерената средна стойност за CAP при извършване на транзиентна еластография с апарат Фиброскан 502 при 170 пациенти е $337,7 \pm 47,44$ dB/m (212 – 400 dB/m). Съответно, средната стойност при мъжете е $343,3 \pm 48,51$ dB/m (226 – 400), а при жените е $332,7 \pm 46,16$ dB/m (212 – 400).



Фигура 25. Измерени стойности за стеатоза чрез CAP на Фиброскан при 170 пациенти с метаболитен синдром. Стойностите на CAP са представени в dB/m.



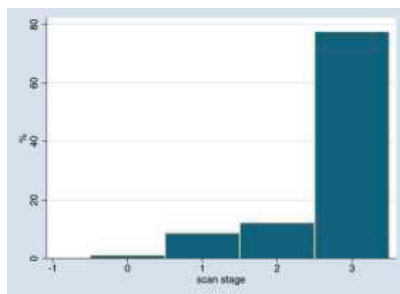
Фигура 26. Скала за интерпретация на резултатите от CAP

Преценката за степента на стеатоза е съобразена с описани cut-off от De Ledingham V. 2012, Karlas T., 2014 и метаанализ на серия от проучвания.

На базата на собствените данни и анализ от предходни международни проучвания сме приели следните cut-off стойности: за S1 – 233 dB/m, S 2 – 270 dB/m и S3 – над 300 dB/m.

При 168 от 170 болни (98.8%) установихме, че има данни за стеатоза в стадий от 1 до 3 според приетите в настоящото проучване cut-off стойности на CAP (за степен S1 – 233 dB/m, за степен S2 – 270 dB/m и за степен S3 – над 300 dB/m). Инструменталното изследване показва, че преобладават болните, които покриват критериите за стадий 3 (132 от 170 пациенти, 77.65%), докато болните със стадий S0, S1 и S2 са, съответно 2 (1%), 15 (9%) и 21 (12%).

Разпределението по пол и степен на стеатоза е както следва: S0 - 2 пациенти (1 мъж и 1 жена); S1 - 15 пациенти (7 мъже и 8 жени); S2 - 21 пациенти (10 мъже и 11 жени); S3 - 132 пациенти (62 мъже и 70 жени).



Фигура 27. Разпределение на болните (в %) според степента на стеатоза, определена с CAP на Фиброскан. Scan stage – степени на стеатоза; 0 – без стеатоза, 1 – първа степен, 2 – втора степен, 3 – трета степен



Фигура 28. Разпределение на болните (в брой и %) според степента на стеатоза, определена с CAP на Фиброскан. S0 – без стеатоза, S1 – първа степен, S2 – втора степен, S3 – трета степен

В изследваната група с метаболитен синдром 77,6% (132 болни) са диагностицирани с тежко изразена трета степен стеатоза (CAP 300 - 400 dB/m), 12,4% (21 болни) с втора степен (S2) и 8,8% (15 болни) с първа степен (S1). При двама от болните (1,2%) е открита S0. Съответно, разпределението на степените стеатоза при мъжете е 77,5 % с S3, 12,5% с S2, 8,8 % с S1, 1,2% с S0, а при жените – 77,8 % с S3, 12,2% с S2, 8,9 % с S1, 1,1% с S0. Това показва преобладаване на тежко изразената стеатоза и сериозни метаболитни нарушения в изследваната група.

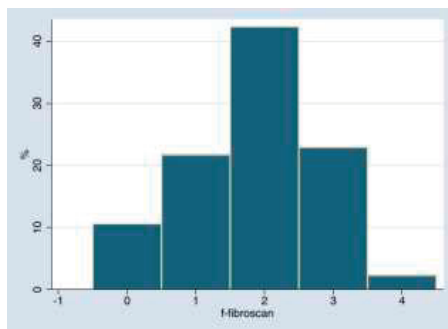


Фигура 29. Разпределение (в брой и по пол) на пациентите според степента на стеатоза, определена с CAP на Фиброскан. S0 – без стеатоза, S1 – първа степен, S2 – втора степен, S3 – трета степен

1.9. Степен на фиброза, преценена чрез измерване на плътността на черния дроб с Фиброскан

Плътността на черния дроб, измерена в килопаскали с апарат Фиброскан, е със средна стойност за цялата група $9,2 \text{ кПа} \pm 5,0$ (3,1 – 46 кПа).

Степента на фиброза е определена при всички пациенти от изследваната група (N=170). При мъжете е установена средна стойност $9,8 \pm 5,8 \text{ кПа}$ (3,4 – 46 кПа), а при жените: $8,8 \text{ кПа} \pm 4,1$ (3,1 – 25,7 кПа).

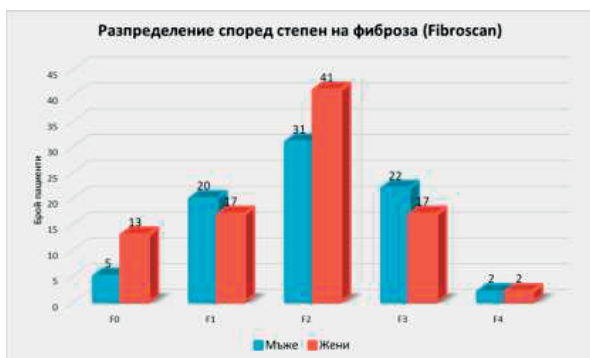


Фигура 30. Разпределение на болните (в %) според степените на фиброза, които са определени чрез Фиброскан. f-fibroscan – степени на фиброза; 0 –

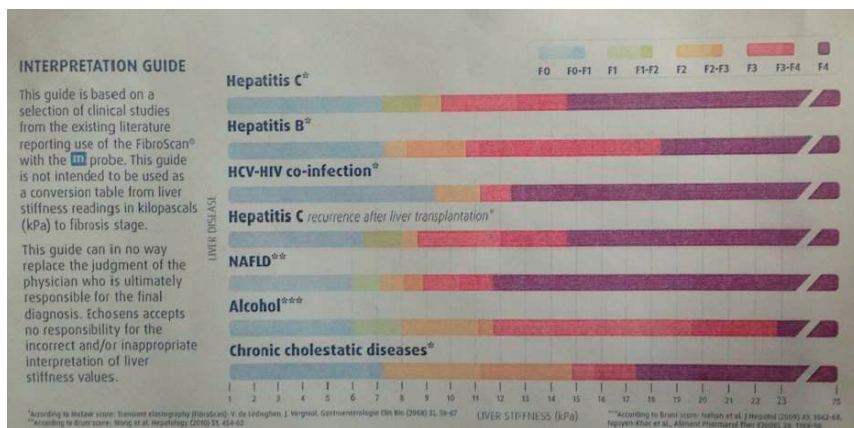
без фиброза, 1 – първа степен, 2 – втора степен, 3 – трета степен, 4 – четвърта степен

При 152 от 170 болни (89.4%) се установява, че има данни за фиброза в степен от 1 до 4 според приетите в настоящото проучване cut-off стойности (съобразно данни от метаанализи при пациенти с NAFLD и NASH): норма до 5 - 5,5 кРа, степен F1 – до 7 кРа, степен F2 – 7,5 до 10 кРа, степен F3 – 10 до 14 кРа, степен F4 >14 кРа. Инструменталното изследване показва, че преобладават болните, които покриват критериите за степен F2 (72 от 170 пациенти, 42.4%, 31 мъже и 41 жени), докато болните със степен F1 и F3 са, съответно 37 (21,8%, 20 мъже и 17 жени) и 39 (22,9%, 22 мъже и 17 жени). При 4 от 170 болни (2,3%, 2 мъже и 2 жени) се установяват данни за фиброза от степен F4 (цироза), а при 18 от 170 болни (10,6%, 5 мъже и 13 жени) с метаболитен синдром не се установява наличие на фиброза чрез изследване с Фиброскан.

Степента на фиброза е разпределена по пол както следва: при мъжете – 5 (6,2 %) с F0, 20 (25%) с F1, 31 (38,8%) с F2, 22 (27,5%) с F3 и 2 (2,5%) с F4, а при жените – 13 (14,4%) с F0, 17 (18,9%) с F1, 41 (45,6%) с F2, 17 (18,9%) с F3 и 2 (2,2%) с F4. Това показва преобладаване на пациентите с умерена фиброза, в стадий на обратимост на измененията при предприемане на адекватни мерки по отношение на хранителен и двигателен режим, както и на лечение за корекция на метаболитното нарушение.



Фигура 31. Разпределение (в брой и по пол) на пациентите според степента на фиброза, определена с Фиброскан. F0 – без стеатоза, F1 – първа степен, F2 – втора степен, F3 – трета степен, F4 – четвърта степен



Фигура 32. Скала за оценка на фиброзата с Fibroscan

1.10. Резултати от чернодробната биопсия

При 135 от 170 пациенти (79,4%) е извършена чернодробна биопсия като при 99 от тях има допълнително и по-подробно експертно разчитане от референтна патологоанатомична лаборатория.

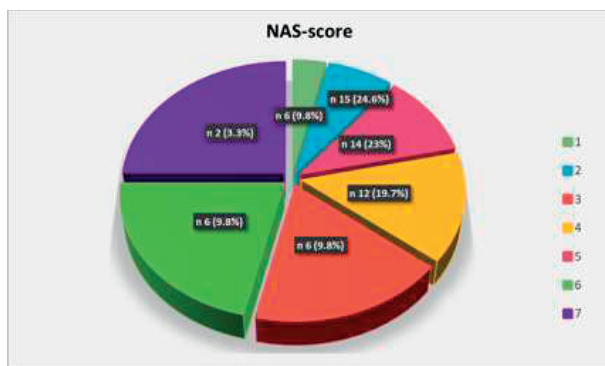
Хистологичните степени са определени в съответствие с процента на стеатоза, както следва: S0 (до 5%), степен S1 (5 – 33%), степен S2 (33 – 66%), S3 (над 66%). Разпределението на болните според хистологичното изследване на пациенти с NAFLD е следното: степен S0 (4 пациенти, 3%), степен S1 (24 болни, 18%), степен S2 (22, 16%) и степен S3 (85 пациенти, 63%).

Хистологичната оценка на чернодробните биопсии (N=135) показва следното разпределение на болните за стадий на фиброза: степен F0 – 8 болни (5,9%), степен F1 – 41 пациенти (30,4%), степен F2 – 61 (45,2%), степен F3 – 22 (16,3%) и степен F4 – 3 болни (2,2%).



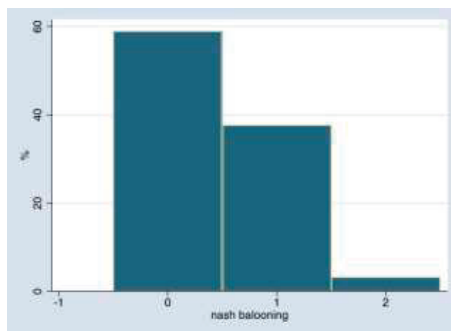
Фигура 33. Разпределение на болните (в брой и %) според резултатите от хистологично изследване на стеатозата (NAFLD, N=135)

При 61 пациенти е определен скорът NAS, включващ оценка на три показателя (SBI: S – стеатоза, В – балониране на хепатоцитите (ballooning) и I – възпаление (inflammation). Средната стойност е 3 ± 2 (1 - 7). Разпределението на болните според NAS скорa е показано на фигурата по-долу:



Фигура 34. Разпределение на болните с NASH (в брой и %) според измерения NAS score от 1 до 7

Установява се, че 41 от 61 болни (67.2%) са с биопсичен скор от 2 до 4, а 14 от 61 пациенти (22.9%) имат скор от 5 до 7. Характерният признак балониране при NASH се наблюдава при 25 пациенти.



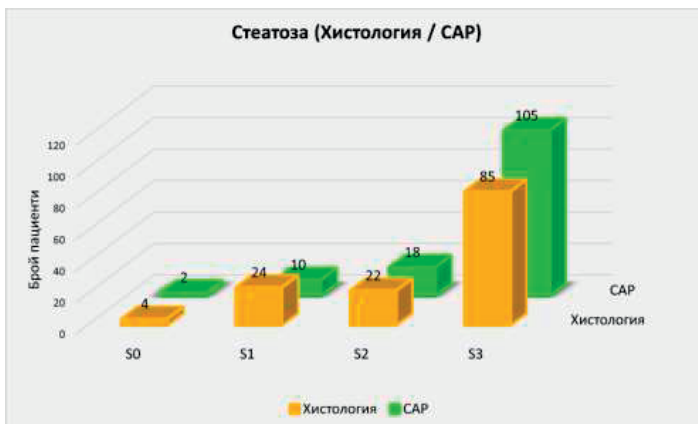
Фигура 35. Разпределение на болните (в %) според оценката за балониране на хепатоцитите (ballooning): 0 – няма, 1 – степен 1, 2 – степен 2

1.11. Съпоставяне на данни за степен на стеатоза от хистологично изследване и транзитентна еластография (CAP на Fibroskan)

При 135 пациенти е извършена чернодробна биопсия и са определени степените на стеатозата. От друга страна, са определени степени на стеатоза от неинвазивното изследване (CAP на Фиброскан). Резултатите от Фиброскан са следните:

- Степен 0 на стеатоза - 2 болни (средна стойност 219 dB/m; мин. 212, макс. 226).
- Степен 1 на стеатоза - 10 болни (средна стойност 250,7 dB/m; мин. 231, макс. 281).
- Степен 2 на стеатоза - 18 болни (средна стойност 292,6 dB/m; мин. 280, макс. 340).
- Степен 3 стеатоза - 105 болни (средна стойност 357,8 dB/m; мин. 301, макс. 400).

Установява се сходно разпределение на болните според степента на чернодробната стеатоза в различните групи, които са изследвани инвазивно (хистологично) и неинвазивно (чрез CAP с Фиброскан).



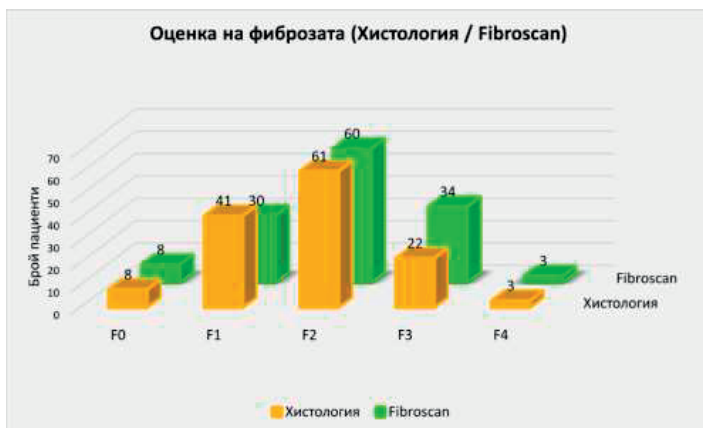
Фигура 36. Разпределение на болните (по брой) според степента на чернодробната стеатоза от хистологично изследване и от неинвазивен метод (CAP, транзитентна еластография с Фиброскан)

Съпоставени са персонално за всеки пациент оценката за стеатоза от хистологичното изследване и резултата, определен с Фиброскан. Хистологично като степен 0 (S0) са оценени 4 пациента, като при 2 CAP също показва степен 0 и това са пациенти с нормален BMI. Другите 2 имат CAP над 300 дВ/м, трета степен стеатоза, но са със затлъстяване и допускаме, че по-скоро хистологичната преценка е некоректна или материалът е бил недостатъчен. С хистологична степен 1 за стеатоза са 24 болни, от тях с CAP за S1 са 5, за S2- 5 и за S3- 14 пациента, т.е. неинвазивният метод с Фиброскан дава по-висока степен на стеатоза в повече от половината случаи. С хистологична степен 2 за стеатоза- 22 болни, от тях CAP показва S1- при 2, S2 при 4 и S3 при 16 пациента, а от 85 болни с тежка степен на стеатоза, оценена хистологично (над 66% от хепатоцитите, изпълнени с мастни капки) - при 73 CAP отговаря на S3 (пълно съвпадение в 86% от пациентите), S2 е при 9 и S1 при 3 пациенти. Количествената оценка е свързана с известен субективизъм, а и самата степен не е определяща, достатъчно е да се знае има ли стеатоза или липсва такава. Не бива да се абсолютизират получените стойности, тъй като резултатите са ориентировъчни.

1.12. Съпоставяне на данни за стадий на фиброза от хистологично изследване на чернодробна биопсия и от оценка на чернодробна плътност с Фиброскан

При 135 пациенти е извършена чернодробна биопсия и са определени степените на фиброза. От друга страна, е измерена чернодробната плътност чрез транзитна еластография (Фиброскан). Получените стойности от Фиброскан са представени в различните групи, както следва:

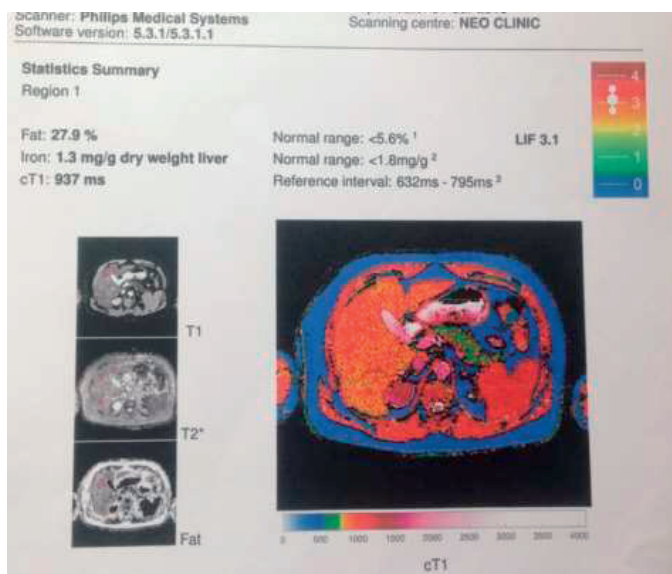
- Стадий F0 – 8 болни (средна стойност 4,4 кПа; мин. 3,5, макс. 5,3). Стойности до 5,5 съгласно ръководните препоръки на европейската федерация по ултразвук EFSUMB се считат за нормални.
- Стадий F1 – 30 болни (средна стойност 6,2 кПа; мин. 5,3, макс. 6,9 кПа)
- Стадий F2 – 60 болни (средна стойност 12,3 кПа; мин. 6,7, макс. 12,3 кПа)
- Стадий F3 – 34 болни (средна стойност 13,7 кПа; мин. 10,2, макс. 24,5 кПа)
- Стадий F4 – 3 болни (средна стойност 24,6 кПа; мин. 18, макс. 30 кПа)



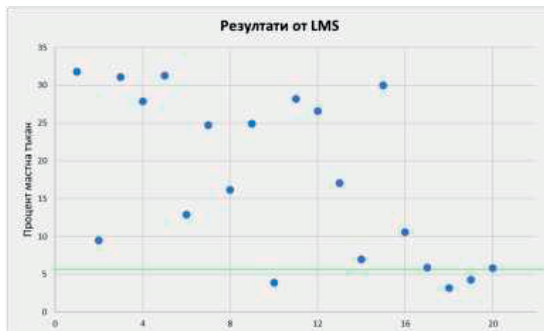
Фигура 37. Разпределение на болните (по брой) според стадия на чернодробната фиброза от хистологично изследване и от неинвазивен метод (транзитна еластография – Фиброскан)

1.13. Резултати от магнитнорезонансна еластография – Liver multiscan (LMS)

При 20 от 170 болни (11,8%) е извършено магнитнорезонансно изследване (Liver MultiScan) в Нео Клиник с апарат Phillips Medical Systems, Software version 5.3.1/ 5.3.1.1, с количествена оценка на натрупаните мазнини в черния дроб, изразени в проценти и изчисление на LIF score (за фиброза). Стойност под 5,6 % за количество мазнини в черния дроб е приета за референтна, съгласно данните на Szczepaniak et al. [Error! Reference source not found.4] За референтни стойности на cT1 (време за надлъжна релаксация, коригирано спрямо желязото) са приети 632 - 795 ms (при изследване на здрави индивиди с BMI<25 kg/m² и количество мазнини в черния дроб < 5%). Измерено е и количеството желязо в mg на g сухо тегло чернодробна тъкан с референтна стойност < 1,8 mg/g.

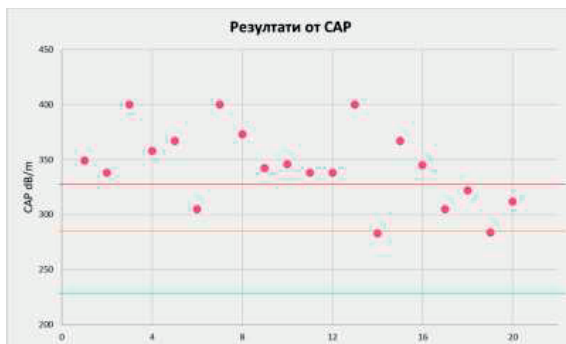


Фигура 38. Резултат от магнитнорезонансна спектроскопия с Liver Multiscan. Резултатът включва: Fat (процент на мазнините), LIF score, Iron (количеството желязо в mg/g сухо тегло чернодробна тъкан), cT1 (време за надлъжна релаксация, коригирано спрямо желязото), референтни стойности за всички показатели.



Фигура 39. Резултати от магнитнорезонансна еластография за процент мастна тъкан в черния дроб при 20 болни. Стойностите под зелената линия (5,6%) са в норма.

Според данни от магнитнорезонансното изследване, средната стойност за степента на стеатоза (% отложени мазнини) е $17,65 \pm 10,83\%$ (мин. 3,2 % и макс. 31,8 %). При 17 от 20 изследвани (85%) се установява повишено отлагане на мазнини (над 5,6% от теглото на черния дроб), а само при 3 от болните (15%) има нормално количество мазнини в черния дроб (под 5,6%).



Фигура 40. Резултати от CAP (в dB/m) при пациентите с извършен LMS (Liver MultiScan-Магнитнорезонансна еластография), N=20

Пациентите с доказана от LMS стеатоза (N=17) имат следните резултати: средна стойност за BMI=33,1, средна стойност за CAP=348,2 dB/m. Трета степен стеатоза (S3) е установена при 16 от тях, втора степен (S2) при 1 болен, което показва съвпадение в оценката на стеатозата с двата метода.

Резултатите от магнитнорезонансното изследване са следните относно LIF score: средна стойност $2,86 \pm 0,64$ (1,1 - 3,8). Този скор оценява степента на фиброза като показател за напреднала фиброза е стойност над 2,3. При 17 от 20 пациенти са установени стойности на LIF над 2,3. Изследването с Фиброскан при тях показва: лека фиброза при 5 болни и напреднала фиброза при 12 болни (9 пациенти с F2 и 3 с F3). От друга страна, при 3 пациенти със стойности на LIF под 2,3 (без данни за фиброза от магнитнорезонансната спектроскопия) се доказва и липса на фиброза (стадий F0) от измерването на чернодробната плътност с Фиброскан. Тези данни показват добра корелация и сходство на двата метода за неинвазивна оценка на чернодробната фиброза.

Средната стойност на cT1 е 917 ± 123 ms (697 - 1241 ms). При 17 болни се откриват стойности над нормата (горна граница 795 ms). При тях е изчислена средна стойност 948 ± 106 ms (828 - 1241 ms). При 3 от 20 болни се установяват нормални стойности: $744 \pm 40,6$ ms (697 - 771 ms).

При всички пациенти измереното **количество желязо в суха чернодробна тъкан** е в границите на нормата: средна стойност $1,14 \pm 0,19$ г (0,9 – 1,5 г). Данните от магнитнорезонансното изследване показват, че не се установява прекомерно отлагане на желязо в черния дроб при пациентите с неалкохолен стеатохепатит. При пациентите с измерено количество отложено желязо в черния дроб е изследвано и серумното ниво на желязото. При 18 от тези 20 болни (90%) е установено нормално серумно ниво на желязото, а при 2 от 20 болни - понижено. Средната стойност на серумното желязо при тези 20 болни е $14,5 \pm 4,1$ (5,2 – 22,8).

Нивото на феритин в серума е в референтни граници при 16 от 20 пациенти с LMS, а при 4 болни е повишено. При четиримата пациенти с повишен феритин (20% от общия брой), измереното количество мастна тъкан варира в широки граници – от норма до S3 (3,2%, 12,9%, 28,2% и 31,3 % мастна тъкан).

Всички болни с мазнини над 5,6 % са без наднормено отлагане на желязо в чернодробната тъкан, въпреки че някои от тях (20%) са с повишен феритин.

1.14. Стойности на феритин

При 119 от 170 пациенти (68,8%) е измерено серумното ниво на феритин. Средната стойност е 223 ± 215 ng/ml (13 - 1158 ng/ml). Нормални стойности са установени при 65 пациенти (54,6%), а повишени, над горна референтна граница, при 54 болни (45,4%; 32 мъже и 22 жени). Референтните граници са следните: 20- 250 ng/ml (за мъже), и 10-120 ng/ml (за жени). При 50 от 54 болни (93%) с повишен серумен феритин се установяват нормални стойности на серумното желязо; 3 пациенти са с намалено и 1 е с повишено ниво. При 25 от 54 пациенти с повишен феритин (46,3%) има данни и за повишен АСАТ. От пациентите с нормален феритин - общо 65, при 55 серумното желязо е в референтни граници, 9 са с понижено и 1 с повишено ниво на серумното желязо, 46 (70,8%) са с нормален АЛАТ и 55 (84,6%) с нормален АСАТ.

Близо половината от изследваните пациенти с метаболитен синдром са с повишени стойности на феритина.



Фигура 41. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според серумното ниво на феритин.

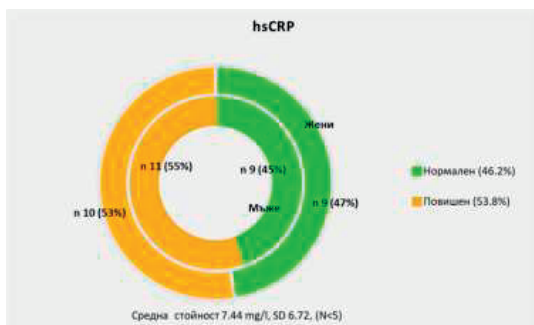
1.15. Стойности на трансферин

При 80 пациенти е измерено серумното ниво на трансферин. Средната стойност е $2,78 \pm 0,44$ g/l (1,24 – 3,68 g/l). Референтните граници са следните:

2,15 – 3,65 g/l за мъжете и 1,9 – 3,75 g/l за жените. Изследвани са 37 мъже и 43 жени. Нормални стойности се установяват при 77 болни (96,2 %), а понижени стойности има само при 3 пациенти (3,8%) като 2 от тях са мъже. Установена е средна стойност на трансферина $2,69 \pm 0,43$ (1,24 – 3,49) при мъжете, а при жените средната стойност е $2,85 \pm 0,43$ (1,43 – 3,68). При жените от общо 43 при 42 трансферинът е в референтни граници и само при 1 е с понижено ниво, а при мъжете от 37 изследвани 35 са с нормални стойности на трансферина и 2 с понижени. Няма пациенти с повишено ниво на трансферин в серума.

1.16. Стойности на hsCRP

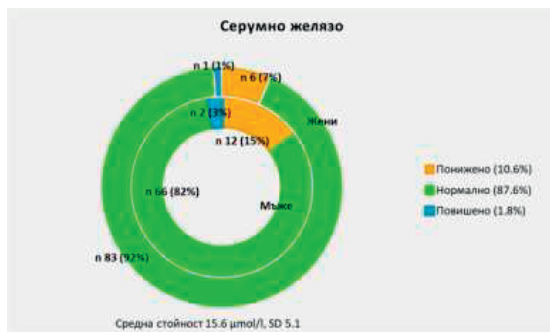
Серумното ниво на високо специфичен С-реактивен протеин като маркер за повишен сърдечно-съдов риск е измерено при 39 пациенти. Установена е средна стойност $7,44 \pm 6,72$ mg/l (0,1 – 29,35 mg/l). Нормални стойности (<5 mg/l) са измерени при 18 пациенти (46,1%), а стойности над горната референтна граница са открити при 21 от 39 болни (53,8%), със средна стойност $11,62 \pm 6,64$ mg/l.



Фигура 42. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на hsCRP (високочувствителен С-реактивен протеин)

1.17. Стойности на серумно желязо

При 149 от 170 пациенти (87,6%) е установено нормално серумно ниво на желязото.

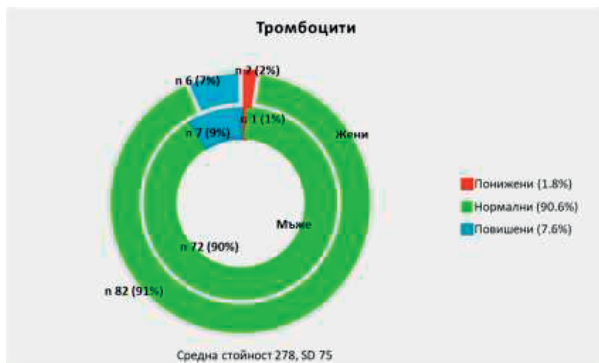


Фигура 43. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на серумното желязо

Стойностите са понижени при 18 от болните (10,6%) и са над горната референтна граница при 3 болни (1,8%). Средната стойност на серумното желязо е $15,6 \pm 5,0$ µmol/l (5,0 – 36,8) за цялата група. За мъжете и жените е установена средна стойност, съответно, $16,8 \pm 5,1$ µmol/l (5,1 – 36,8) и $14,6 \pm 5,0$ µmol/l (5,0 – 32,4).

1.18. Стойности на тромбоцитите

При 154 пациенти (90,6%) се откриват нормални стойности на тромбоцитите. Повишени стойности се установяват при 13 (7,6%), а понижени едва при 3 (1,8%) болни. Изчислената средна стойност е $278 \pm 75 \times 10^9$ /л (96 - 477). Пациентите с понижени стойности на тромбоцитите са със затлъстяване, тежка стеатоза (степен S3 от Фиброскан), умерена или напреднала фиброза (степен F1 от Фиброскан при 1 болен, и степен F3 при двама от болните). Тромбоцитите са включени в индекса за неинвазивна оценка на чернодробната фиброза FIB-4 (заедно с възраст, АСАТ, АЛАТ).

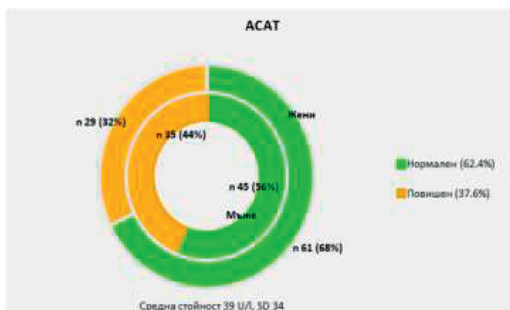


Фигура 44. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на тромбоцитите

1.19. Стойности на чернодробните ензими.

1.19.1. Стойности на АСАТ

В настоящото проучване са установени повишени стойности на АСАТ при 64 от 170 болни (37,6%), а при останалите 106 пациенти (62,4%) се откриват стойности в референтните граници. Средната стойност на АСАТ е 39 ± 34 U/l (9 - 278 U/l).



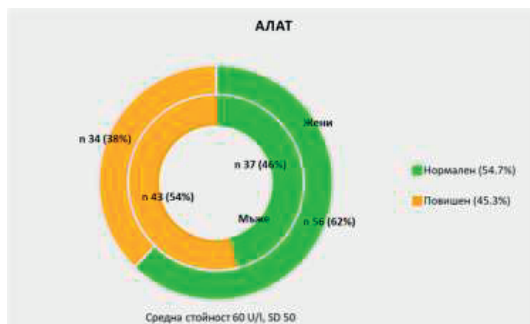
Фигура 45. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на АСАТ

При посочените 106 пациенти с нормални стойности на АСАТ фиброзата, оценена с Фиброскан, показва F0 при 16, F1 при 24, F2 при 47,

F3 при 17 и F4 при 2, т.е. с умерена и напреднала фиброза (F2-F4) са 90 пациенти, т.е. 85%.

1.19.2. Стойности на АЛАТ

Повишени стойности на АЛАТ са открити при 77 от 170 болни (45,3%), а при останалите 93 пациенти (54,7%) ензимът е в норма. Изчислената средна стойност на АЛАТ е 60 ± 50 U/l (12 – 309 U/l).



Фигура 46. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на АЛАТ

86 пациенти имат нормални стойности както на АСАТ, така и на АЛАТ, като от тях с неинвазивно определена фиброза F0 са 16, F1 -18, F2-39, F3- 18 и F4- 2, т.е. с умерена и напреднала фиброза (F2-F4) са 69%. При тези пациенти с нормални трансаминази ГГТ е в норма при 55, а при 31 е повишен и корелира с висока степен на стеатоза (S3- 22, S2- 4, S1-5). При чернодробна стеатоза е по-показателно покачването на ГГТ отколкото на трансаминазите.

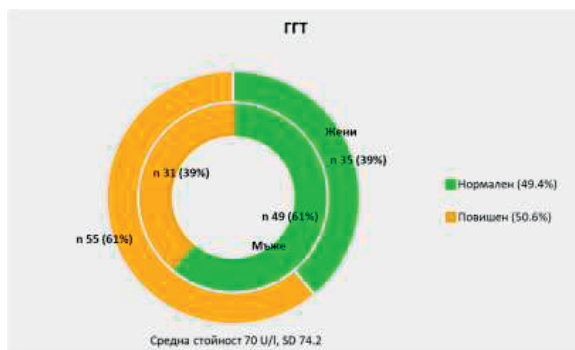
От 132 пациенти с изразена стеатоза от Фиброскан (степен S3) при 70 (53%) се установяват нормални стойности за АЛАТ, а при 77 пациенти (58,3%) - нормален АСАТ. Тези резултати показват, че нормалните чернодробни ензими не изключват напреднало чернодробно клетъчно увреждане и освен лабораторни изследвания са наложителни и образни методи за оценка състоянието на черния дроб.

Съгласно препоръка на ACG (American College of Gastroenterology), публикувана през 2017 г. в статия на Paul Kwo от университета в Станфорд, за истински нормални се приемат стойности на АЛАТ от 29 до 33 IU/L за мъжете и от 19 до 25 IU/L за жените. При така заложили критерии в изследваната от нас група пациенти с АЛАТ над 33 IU/L са 68,8% от мъжете

(55 от 80), а с АЛАТ над 25 IU/L са 74,4 % от жените (67 от 90). Относно АСАТ- съответно със стойности над 33 IU/L са 41 мъже (51,3%) , а над 25 IU/L- 43 жени (47,8%).

1.19.3. Стойности на ГГТ

Повишени стойности на ГГТ са установени при 86 от 170 болни (50,6%), докато при останалите 84 пациенти (49,4 %) ГГТ е в норма. Средната стойност за цялата група е $70 \pm 74,2$ U/l (8 – 799 U/l). От тези с повишен ГГТ с САР S0 е 1, с S1- 7, с S2- 14, а с S3- 64 пациенти (74%). Повишеният ГГТ насочва към изразена стеатоза на черния дроб.



Фигура 47. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на ГГТ

От друга страна в групата с тежка стеатоза (степен S3, измерена с Фиброскан; N=132) при 68 пациенти (51,5%) са регистрирани нормални стойности за ГГТ. Покачването му насочва към прекомерно натрупване на мазнини в черния дроб, но не е задължителна находка и се обуславя вероятно и от въздействието на други фактори.

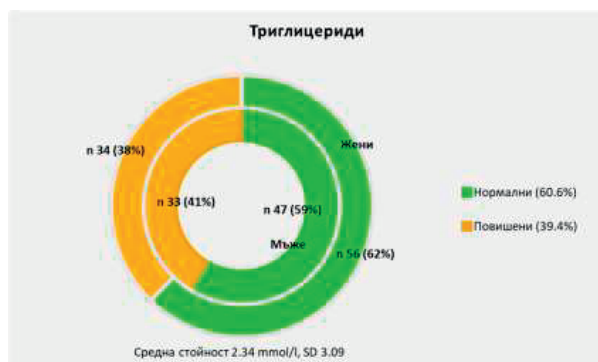
1.19.4. Стойности на АФ (алкална фосфатаза)

При почти всички пациенти (168 от 170, 98,8%) стойностите на алкалната фосфатаза в серума са в референтни граници, само при 2 (1,2%) са малко над горната референтна граница. За разлика от холестазните синдроми, при които има успоредно покачване на ГГТ и АФ, при

чернодробната стеатоза е характерно изолираното повишаване на ГГТ при нормална АФ. Билирубинът също се запазва в референтни граници.

1.20. Стойности на триглицериди

Средната стойност на триглицеридите в серума е $2,34 \pm 3,09$ mmol/l ($0,72 - 36,6$ mmol/l). При 103 пациенти (60,6 %) те са в референтни граници, а при 67 (39,4%) са повишени.



Фигура 48. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на триглицеридите

Нормални нива на триглицеридите се установяват при 78 от 132 пациенти (59,1%) с изразена стеатоза S3, измерена с Фиброскан.

1.21. Стойности на HDL

При 131 пациенти е измерен HDL, от тях 66 мъже и 65 жени. Средната стойност на HDL в серума е $1,14 \pm 0,36$ mmol/l ($0,56 - 3,17$ mmol/l). При мъжете с нормален HDL ≥ 1 mmol/l са 26 (39%), а със стойности < 1 mmol/l са 40 (61%). При жените с HDL $\geq 1,3$ mmol/l са 28 (43%), а с понижени стойности $< 1,3$ mmol/l са 37 (57%). Така общо за изследваната група с намален HDL са 77 пациента (58,8%), а с нормален 54 (41,2%).

1.22. Стойности на пикочната киселина

Изчислената средна стойност на пикочната киселина в серума е 394 ± 101 $\mu\text{мол/л}$ ($176 - 611$ $\mu\text{мол/л}$), като стойности над горна референтна граница са установени при 55 от 91 пациенти (60,4%), а нормални при 36 пациенти (39,6%). От тези с повишена пикочна киселина с S3 от CAP са 46 (85%), с S2- 5, S1- 3 и S0- 1, т.е. преобладават случаите с тежко изразена стеатоза.



Фигура 49. Разпределение (в брой и %) на болните по пол и според стойностите на пикочната киселина

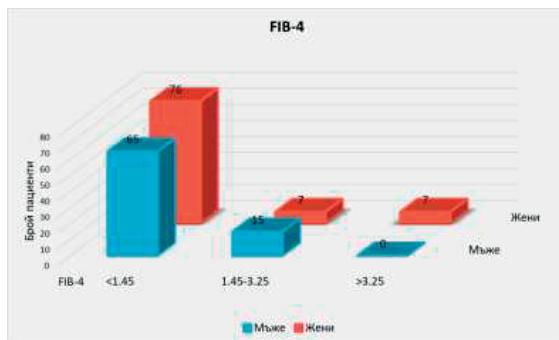
1.23. Стойности на FIB-4

В изследваната група от 170 пациенти при всички е изчислен FIB-4 като показател за оценка на степента на фиброза. Средната стойност е $1,06 \pm 0,85$ ($0,2 - 6,4$). Стойности под 1,45, които отговарят на степен F0 – F1, са отчетени при 141 пациенти (82,9%) като средната стойност е $0,78 \pm 0,3$. Стойности от 1,45 до 3,25, приети за умерена чернодробна фиброза, се установяват при 22 болни (12,9%). Средната стойност на FIB-4 за тази група е $1,88 \pm 0,38$. С напреднала фиброза (степен F3 и F4), FIB-4 над 3,25 са 7 пациенти (4,2%). Средната стойност е $4,39 \pm 1,0$. В групата от 7 болни с напреднала фиброза всички са с хистологични данни за NASH, F3/F4 фиброза от чернодробната биопсия, повишени ГГТ и АСАТ, а с повишен АЛАТ са 5 пациенти. Измерването с Фиброскан при тази група пациенти показва F2 при 2, F3/F4 при 5 пациенти, а по отношение на стеатозата: S3 при 6 и S2 при 1.

При пациентите с FIB-4 за умерена фиброза ($1,45-3,25$) – общо 22, само 1 пациент е с намалени тромбоцити, 21 са с нормални; по отношение

на ACAT 15 са с повишени стойности, а 7 с нормални, а за ГГТ - 12 са с повишени и 10 с нормални стойности.

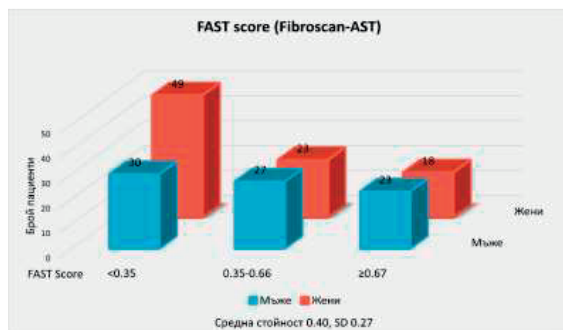
Получените резултати доказват надеждността на FIB-4 за отдиференциране на пациентите с напреднала фиброза и добрата корелация с резултатите от изследване с транзиентна еластография и биопсия на черния дроб.



Фигура 50. Разпределение на болните по пол и според стойностите на FIB-4.

1.24. Стойности на FAST score

FAST score се определя чрез въвеждане в програмата с мобилно приложение на измерените стойности на CAP в dB/m, на плътността в kPa от изследването с Фиброскан и резултата за ACAT. За включените 170 пациенти средната стойност на измерения FAST score е 0,40 (вариращ от 0 до 0,95), $SD \pm 0,27$. С FAST score <0,35 са 79 пациента (46,5%, 30 мъже и 49 жени), от 0,35 до 0,67 – с вероятен нерисков NASH 50 пациента (29,4%, 27 мъже и 23 жени), а $\geq 0,67$ – 41 пациента (24,1%, 23 мъже и 18 жени), с напреднала фиброза и изразена активност на NASH и риск за прогресия и усложнения. При тези 41 пациенти с FAST score $\geq 0,67$ с CAP S3 са 39, а с Фиброза 2,3,4 степен 40.



Фигура 51. Разпределение на болните по пол и според стойностите на FAST score.

1.25. Обобщени демографски, клинични и лабораторни данни на изследваната група болни с метаболитен синдром (N=170)

Таблица 4. Характеристика на групата пациенти

Показател	Мъже (N=80, 47%)	Жени (N=90, 53%)	Общо (N=170)
Възраст (mean±sd)	49,13 ± 9,52	52,49 ± 12,62	50,91 ± 11,36
ЗД, тип 2 (N,%)	39 (48,75)	51 (56,67)	90 (52,94)
Предиабет (N,%)	6	9	15
BMI (mean±sd)	35,86 ± 7,01	34,79 ± 7,01	35,29 ± 7,01
Наднормено тегло (N,%)	17	20	37 (21,8%)
Затлъстяване (N,%)	62	69	131 (77%)
I степен	23	29	52 (30,6%)
II степен	17	23	40 (23,5%)
III степен	22	17	39 (22,9%)
Обиколка на талия (см) (mean±sd)	115,9 ± 12,75	105,4 ± 10,40	110,2 ± 12,63
> 94 см (N,%)	38 (95%)	n.a.	n.a.
> 80 см (N,%)	n.a.	46 (100%)	n.a.
Артериална хипертония (N,%)	59	67	126 (74,1%)
Пушачи (N,%)	49	39	88 (51,8%)

Таблица 5. Обобщени лабораторни данни на изследваната група пациенти

Лабораторен показател (N = брой изследвани)	Средна стойност	SD	В норма (N, %)	Извън норма (N,%) (повишени или понижени стойности)	
АСАТ (N=170)	39	34	106 (62,4%)	повишени – 64 (37,6%)	
АЛАТ (N=170)	60	34	93 (54,7%)	повишени – 77 (45,3%)	
ГГТ (N=170)	70	74,2	84 (49,4%)	повишени – 86 (50,6%)	
Тромбоцити (N=170)	278	75	154 (90,6%)	повишени – 13 (7,6%) понижени – 3 (1,8%)	
Феритин (N=119)	223	215	65 (54,6%)	повишени – 54 (45,4%)	
Трансферин (N=80)	2,78	0,44	77 (96,2%)	понижени – 6 (7,5%)	
Серумно желязо (N=170)	15,6	5,1	149 (87,6%)	повишени – 3 (1,8%) понижени – 18 (10,6%)	
hsCRP (N=39)	7,44	6,72	18 (46,2%)	повишени – 21 (53,8%)	
Триглицериди (N=170)	2,34	3,09	103 (60,6%)	повишени – 67 (39,4%)	
HDL (N=131)	1,14	0,36	54 (41,2%)	понижен – 77 (58,8%)	
FIB-4 (N=170)	1,06	0,85	141 (82,9%)	1,45 – 3,25	N=22 (12,9%)
				>3,25	N=7 (4,2%)
Пикочна киселина (N=91)	394	101	36 (39,6%)	повишени – 55 (60,4%)	

Анализ на лабораторните показатели е проведен поотделно за мъжки и женски пол. В резултат на това са формирани категорийни показатели, които отразяват общия брой болни (мъже и жени) със стойности в референтните граници или с отклонения от нормата. Резултатите за дял на отклоненията в лабораторните показатели са получени при статистическата обработка на данните. По-високи стойности са открити за феритин (при 54 от 119 болни; 45,4%), АСАТ (64 от 170; 37,6%), АЛАТ (77 от 170; 45,3%), ГГТ (86 от 170; 50,6%), триглицериди (67 от 170; 39,4%) и пикочна киселина (55 от 91; 60,4%). Повишение или понижение е установено за серумно желязо (3 от 170; 1,8% с повишени стойности, и 18 от 170; 10,6% с понижени стойности), и брой тромбоцити (13 от 170; 7,7% с повишение, и 3 от 170; 1,8% с намаление). По-ниски стойности спрямо референтните на трансферин са установени при минимален брой болни (6 от 80; 7,5%).

Преобладаващи са нормалните стойности на серумно желязо, тромбоцити и трансферин.

2. Статистически анализ на данните

2.1. Дескриптивен статистически анализ на количествените променливи

Количествените променливи са представени по-надолу като са разделени на клинични, лабораторни и инструментални (вж. таблиците):

Таблица 6. Дескриптивен статистически анализ на клиничните фактори

Stats	Възраст	BMI	Ръст	Тегло	Талия
N	170	170	170	170	91
Mean	50.9	35.3	168.4	100.3	110.8
Sd	11.4	7	9.4	23.1	12.9
Min	20	22	146	58	86
Max	76	75.5	191	198	143
P50	51	34.4	169	96.8	112
Коефициент на асиметрия	-0.3	1.5	0.003	0.97	0.16
Коефициент на ексцес	2.7	8.8	2.56	4.3	2.6

Max – максимална стойност, *Mean* – средна стойност, *Min* – минимална стойност, *N* – брой болни, *P50* – медиана, *sd* – стандартно отклонение, *Stats* – статистически изчисления

Таблица 7. Дескриптивен статистически анализ на лабораторни фактори (1 част)

Stats	hsC RP	Transf erin	Iron	Ferri tin	Thr	AS T	AL T	GG T	Homa- IR	FIB 4
N	60	80	170	119	170	170	170	170	63	170
Mean	6.61	2.77	15.6	223	277.9	39.4	59.9	70.0	6.02	1.1
Sd	6.07	0.44	5.1	215	74.7	34.1	49.7	74.2	6.57	0.8
Min	0.1	1.24	5.0	13	96	9	12	8	1.09	0.2
Max	29.35	3.68	36.8	1158	477	278	309	799	37	6.4
P50	5.08	2.79	15.0	154	274.5	28	43	50	3.96	0.9
Коефициент на асиметрия	1.68	-0.62	0.82	1.9	0.3	3.4	2.1	5.9	3.1	3.2
Коефициент на ексцес	5.83	4.45	4.6	6.4	2.7	19.1	8.5	56.2	13.0	15.7

ALT – АЛТ, AST – АСАТ, GGT – ГГТ, Iron – серумно желязо, Ferritin – феритин, Max – максимална стойност, Mean – средна стойност, Min – минимална стойност, N – брой болни, P50 – медиана, sd – стандартно отклонение, Stats – статистически изчисления, Thr – тромбоцити, Transferrin – трансферин

Таблица 8. Дескриптивен статистически анализ на лабораторни фактори (2 част)

Stats	Chol	Trigl	HDL	LDL	Uric acid	HbA1c	Gluc
N	170	170	131	127	91	155	170
Mean	5.39	2.54	1.14	3.2	393.9	6.37	6.4
Sd	1.19	3.77	0.36	0.91	101.0	1.37	1.9

Min	2.14	0.7	0.56	0.89	176	4.7	4.2
Max	8.51	36.6	3.17	5.68	611	12.1	19.5
P50	5.34	1.82	1.05	3.20	393	6	6
Коефициент на асиметрия	-0.05	7.2	1.9	0.07	-0.1	1.9	2.8
Коефициент на ексцес	3.0	59.9	10.5	3.4	2.7	6.7	15.5

Chol – холестерол, *Gluc* – серумна глюкоза, *Max* – максимална стойност, *Mean* – средна стойност, *Min* – минимална стойност, *N* – брой болни, *P50* – медиана, *sd* – стандартно отклонение, *Stats* – статистически изчисления, *Trigl* – триглицериди, *Uric acid* – пикочна киселина

Таблица 9. Дескриптивен статистически анализ на инструментални фактори

Stats	CAP	Stiffness	LMS	LIF score	MRI	Iron-liver
N	170	170	20	20	20	20
Mean	338	9.2	17.7	2.86	917	1.13
Sd	47	5.0	10.8	0.64	123	0.19
Min	212	3.1	3.2	1.1	697	0.9
Max	400	46	31.8	3.8	1241	1.5
P50	342	8.4	16.7	3.1	917	1.1
Коефициент на асиметрия	-0.5	3.4	-.003	-1.3	0.7	0.3
Коефициент на ексцес	2.4	21.7	1.4	4.3	3.8	1.9

Chol – холестерол, *Iron liver* – количество желязо от магнитно-резонансна еластография, *LIF score* – LIF скор, *Max* – максимална стойност, *Mean* – средна стойност, *Min* – минимална стойност, *N* – брой болни, *P50* – медиана, *sd* – стандартно отклонение, *Stats* – статистически изчисления, *Stiffness* – плътност от Фиброскан

Анализът на коефициентите на асиметрия и ексцес показва, че по-голямата част от количествените параметри имат ляво или дясно асиметрично разпределение.

2.2. Сравнения между подгрупи със стеатоза (непараметричен тест на Kruskal-Wallis, тест на Dunn с Bonferroni корекция, рангова корелация на Spearman)

Непараметричният тест на Kruskal-Wallis по рангове е използван, за да се определи дали трите независими групи (с първи, втори или трети стадий на стеатоза), които са разграничени чрез FibroScan, се различават по отношение на анализирания клинични, лабораторни и инструментални фактори (измерени в абсолютната скала).

Стадиите на стеатоза са определени въз основа на стойностите на CAP и това се илюстрира от високото ниво на статистическа значимост при сравнение на подгрупите спрямо този фактор – $\chi^2(df3)=86.897$, $P=0.0001$.

Таблица 10. Сравнение между подгрупите с чернодробна стеатоза чрез теста на Kruskal-Wallis въз основа на стойностите на CAP.

```
. kwallis cap, by(scanstage)

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

scanst-e	Obs	Rank Sum
0	2	3.00
1	15	151.50
2	21	630.50
3	132	13750.00

```
chi-squared = 86.693 with 3 d.f.
probability = 0.0001

chi-squared with ties = 86.897 with 3 d.f.
probability = 0.0001
```

Приложенията в настоящото проучване cut-off стойности на CAP (за степен S1 – 233 dB/m, за степен S2 – 270 dB/m и за степен S3 – над 300 dB/m) разграничават с високо ниво на статистическа значимост ($p=0.001$) подгрупите с чернодробна стеатоза

Таблица 11. Резултати от тест на Kruskal-Wallis за установяване на статистически значими различия между три групи със стеатоза по отношение на клинични, лабораторни и инструментални фактори (измерени в абсолютна скала)

Показатели	$\chi^2(df3)$	P-value
Клинични		
Възраст	0.174	0.981
BMI	15.383	0.001
Ръст	1.854	0.603
Тегло	6.918	0.075
Обиколка на талия	2.742	0.254
Лабораторни		
hsCRP	6.638	0.084
Трансферин (абсолютни стойности)	4.559	0.102
Желязо (абсолютни стойности)	9.600	0.022
Феритин (абсолютни стойности)	2.288	0.515
Тромбоцити (абсолютни стойности)	1.266	0.737
АЛАТ (абсолютни стойности)	9.392	0.025

АСАТ (абсолютни стойности)	9.238	0.026
ГГТ (абсолютни стойности)	1.565	0.667
НОМА	11.064	0.011
FIB4	3.038	0.386
Общ холестерол	1.244	0.743
LDL-холестерол	3.909	0.272
HDL-холестерол	3.946	0.267
Триглицериди	2.688	0.442
Пикочна киселина (абсолютни стойности)	1.440	0.696
Кръвна захар	3.645	0.303
HbA1c	6.592	0.086
Инструментални		
CAP	86.897	0.0001
Stiffness (плътност)	13.917	0.003
LMS	2.286	0.131
Lif score	0.331	0.565
MRI	0.254	0.614
Iron liver	2.358	0.125

Непараметричният тест на Kruskal-Wallis показва, че статистически значима разлика между трите групи със стеатоза се открива по отношение на следните показатели: CAP и чернодробна плътност (stiffness) с Фиброскан, BMI, серумно желязо, АЛАТ, АСАТ, Ном-IR.

Факторите с доказана статистическа значимост при теста на Kruskal-Wallis са подложени на допълнителен (post hoc) анализ чрез теста на Dunn и използване на Bonferroni корекция. Установява се, че BMI е значимо различен при болните с 3 стадий стеатоза спрямо тези с 1 стадий (36.2 срещу 32.0; $p=0.0369$) или без стеатоза (36.2 срещу 23.7; $p=0.0325$).

Таблица 12. Сравнение между подгрупите с чернодробна стеатоза чрез теста на Dunn въз основа на BMI

Dunn's Pairwise Comparison of bmi by scanstage (Bonferroni)			
Col Mean- Row Mean	0	1	2
1	-1.504772 0.3971		
2	-1.771946 0.2292	-0.528045 1.0000	
3	-2.547510 0.0325	-2.503741 0.0369	-2.143965 0.0961

С 3, 2, 1 и 0 са означени съответно подгрупите с трета, втора, първа степен и без стеатоза. Тестът на Dunn открива, че BMI разграничава 3 степен на стеатоза спрямо 1 степен ($p=0.0369$), както и групата без стеатоза ($p=0.0325$)

Установява се, че нивата на серумно желязо, АЛАТ, АСАТ и Ном-IR са различни при 3 стадий стеатоза в сравнение с 1 стадий. Изчислени са следните средни стойности и нива на статистическа значимост: серумно желязо (16.0 срещу 12.1; $p=0.0087$), АЛАТ (62.0 срещу 31.2; $p=0.0066$), АСАТ (40.7 срещу 12.5; $p=0.0079$) и Ном-IR (6.91 срещу 3.17; $p=0.0326$).

Таблица 13. Сравнение между подгрупите с чернодробна стеатоза чрез теста на Dunn въз основа на серумното желязо и АЛАТ

Dunn's Pairwise Comparison of iron by scanstage (Bonferroni)			
Col Mean- Row Mean	0	1	2
1	0.161955 1.0000		
2	-0.816544 1.0000	-2.148034 0.0951	
3	-0.968073 0.9990	-2.978670 0.0087	-0.363690 1.0000

Dunn's Pairwise Comparison of alat by scanstage (Bonferroni)			
Col Mean- Row Mean	0	1	2
1	1.131061 0.7741		
2	0.142529 1.0000	-2.206575 0.0820	
3	0.024309 1.0000	-3.061252 0.0066	-0.375229 1.0000

alat – АЛАТ, iron – серумно желязо. Останалите означения са както в таблица 12. Тестът на Dunn открива, че серумното желязо и АЛАТ разграничават 3 степен на стеатоза спрямо 1 степен, съответно с $p=0.0087$ и $p=0.0066$

Таблица 14. Сравнение между подгрупите с чернодробна стеатоза чрез теста на Dunn въз основа на ACAT и HOMA-IR

Dunn's Pairwise Comparison of asat by scanstage (Bonferroni)				Dunn's Pairwise Comparison of homa by scanstage (Bonferroni)			
Col Mean- Row Mean	0	1	2	Col Mean- Row Mean	0	1	2
1	1.302186 0.5786			1	-0.648831 1.0000		
2	0.412417 1.0000	-1.996843 0.1375		2	-0.922215 1.0000	-0.546768 1.0000	
3	0.225692 1.0000	-3.007462 0.0079	-0.614640 1.0000	3	-1.706485 0.2638	-2.547142 0.0326	-1.824776 0.2041

asat – ACAT, homa – HOMA-IR. Останалите означения са както в таблица 12. Тестът на Dunn открива, че HOMA-IR разграничава 3 степен на стеатоза спрямо 1 степен $p=0.0326$, а ACAT не показва статистически значими разлики между подгрупите.

Рангова корелация на Spearman е използвана, за да се изчисли асоциацията на стеатозата, която е определена чрез FibroScan, с анализирани номинални клинични и лабораторни фактори. Тестът показва наличие на статистически значима връзка на стеатозата със следните фактори: метаболитен синдром, артериална хипертония и повишени стойности на ACAT. Корелационната зависимост е слаба и за трите фактора, тъй като корелационният коефициент на Spearman е със стойности под 0.3.

Таблица 15. Резултати от рангова корелация на Spearman за установяване на статистически значима асоциация на стеатозата с номинални клинични и лабораторни фактори

Показатели	Spearman's ρ	N	P-value
Клинични			
Пол	0.0031	170	0.9676
Артериална хипертония	0.2421	170	0.0015
Захарен диабет	-0.1201	170	0.1187

Метаболитен синдром	0.2437	170	0.0014
Тютюнопушене	0.0796	170	0.3019
Лабораторни			
Трансферин (отклонение от нормата)	- 0.1300	80	0.2504
Желязо (отклонение от нормата)	- 0.0567	170	0.4626
Феритин (отклонение от нормата)	0.0150	119	0.8714
Тромбоцити (отклонение от нормата)	- 0.0081	170	0.9170
АЛАТ (отклонение от нормата)	0.0837	170	0.2776
АСАТ (отклонение от нормата)	0.1642	170	0.0323
ГТТ (отклонение от нормата)	- 0.0664	170	0.3896
Триглицериди (отклонение от нормата)	0.0607	170	0.4318
Пикочна киселина (отклонение от нормата)	0.0931	91	0.3801

2.3. Сравнения между подгрупи с фиброза (непараметричен тест на Kruskal-Wallis, тест на Dunn с Bonferroni корекция, рангова корелация на Spearman)

Тестът на Kruskal-Wallis е приложен и за анализ на разликите между четири независими групи на болни с фиброза, които са определени чрез FibroScan. Статистически значима разлика между четирите групи се открива в следните показатели: възраст, BMI, телесно тегло, обиколка на талия, тромбоцити, АЛАТ, АСАТ, FIB-4, пикочна киселина, CAP, stiffness (плътност от Фиброскан), LIF score, MRI.

Таблица 16. Резултати от тест на Kruskal-Wallis за установяване на статистически значими различия между четири групи с чернодробна фиброза по отношение на клинични, лабораторни и инструментални фактори (измерени в абсолютна скала)

Показатели	$\chi^2(df4)$	P-value
Клинични		
Възраст	9.978	0.041
BMI	19.446	0.0006
Ръст	6.674	0.154
Тегло	18.586	0.0009
Обиколка на талия	14.623 (df3)	0.002
Лабораторни		
hsCRP	0.378	0.945
Трансферин (абсолютни стойности)	3.941	0.268
Желязо (абсолютни стойности)	5.304	0.258
Феритин (абсолютни стойности)	6.318	0.097
Тромбоцити (абсолютни стойности)	12.227	0.016
АЛАТ (абсолютни стойности)	10.739	0.03
АСАТ (абсолютни стойности)	16.365	0.003
ГГТ (абсолютни стойности)	3.485	0.480
НОМА	6.365	0.174
FIB4	26.290	0.0001
Общ холестерол	5.580	0.233
LDL-холестерол	4.510	0.341
HDL-холестерол	2.590	0.629
Триглицериди	3.815	0.432
Пикочна киселина (абсолютни стойности)	19.264	0.0007

Кръвна захар	5.546	0.236
HbA1c	0.915	0.922
Инструментални		
CAP	25.013	0.0001
Stiffness	147.707	0.0001
LMS	7.277	0.064
LIF score	9.872	0.02
MRI	9.331	0.025
Iron liver	6.555	0.087

Факторите с доказана статистическа значимост при теста на Kruskal-Wallis са подложени на допълнителен (post hoc) анализ чрез теста на Dunn и използване на Bonferroni корекция. Болните с 2 и 3 стадий на фиброза са значимо по-възрастни спрямо тези с 1 стадий, както следва: 53.3 срещу 46 години ($p=0.0226$), и 51.8 срещу 46 години ($p=0.0336$).

ВМІ е значимо различен при болните с 2 и 3 стадий фиброза спрямо тези без фиброза, както следва: 35.2 срещу 30.5; $p=0.0103$ и 37.3 срещу 30.5; $p=0.0001$. В съответствие с това, при 2 и 3 стадий на фиброза се установява по-високо телесно тегло (кг) в сравнение с болните без данни за фиброза: 98.6 срещу 83.9; $p=0.0237$ и 109.8 срещу 83.9; $p=0.0002$. Обиколката на талията се различава значимо в същите групи: 110.9 срещу 99.9; $p=0.0438$ и 117.0 срещу 99.9; $p=0.0016$.

По-ниски стойности на тромбоцитите се установяват в подгрупата с 3 стадий фиброза в сравнение с 1 стадий: 250 744 спрямо 303 027; $p=0.0102$. Стойностите на АЛАТ са повишени в стадий 3 на фиброза в сравнение с болните без фиброза (74.5 срещу 34.7; $p=0.0074$). АСАТ е с повишени стойности в 3 стадий на фиброза в сравнение с 1 стадий, както и при болните без данни за фиброза, както следва: 54.7 спрямо 31.3; $p=0.0332$, и, 54.7 срещу 24.1; $p=0.0039$.

По отношение на FIB-4 се открива значимо увеличение на средните стойности във 2 и 3 стадий на фиброза в сравнение с 1 стадий, както следва: 1.02 срещу 0.68; $p=0.0059$, и, 1.39 спрямо 0.68; $p<0.0001$.

Средните стойности на пикочната киселина са по-високи при 2, 3 и 4 стадий на фиброза в сравнение с болните без данни за фиброза. Резултатите

са следните: за стадий 2 фиброза – 419.9 спрямо 255.4; $p=0.0043$. За стадий 3 фиброза – 412.3 срещу 255.4; $p=0.0128$, и, за стадий 4 фиброза – 455.3 спрямо 255.4; $p=0.0333$.

LIF score и MRI са различни с високо ниво на статистическа значимост при болните с 2 и 3 стадий фиброза спрямо тези без фиброза, както е изброено по-надолу. За LIF (2 стадий фиброза срещу болни без фиброза): 3.12 ± 0.38 срещу 1.82 ± 0.47 ; $p=0.0168$. За LIF (3 стадий фиброза срещу болни без фиброза): 3.2 ± 0.1 срещу 1.82 ± 0.47 ; $p=0.0184$. За MRI (2 стадий фиброза срещу болни без фиброза): 969.77 ± 128.78 срещу 765 ± 54 ; $p=0.0158$. За MRI (3 стадий фиброза срещу болни без фиброза): 969 ± 49 срещу 765 ± 54 ; $p=0.0311$.

Стадиите на фиброза са определени чрез изследване с FibroScan и използване на показателя stiffness (плътност). Установява се много добро разграничаване на стадиите фиброза в изследваната група болни: стадий 1 – 6.18 ± 0.48 (медиана 6.1); стадий 2 – 8.60 ± 1.32 (медиана 8.55); стадий 3 – 13.4 ± 3.3 (медиана 12.4); стадий 4 – 29.9 ± 11.8 (медиана 27.8).

Таблица 17. Сравнение между подгрупите с чернодробна фиброза чрез теста на Dunn въз основа на показателя stiffness (плътност) от Фиброскан

Summary for variables: stiffness
by categories of: ffibrosan (F-fibrosan)

ffibrosan	mean	sd	p50	min	max
0	4.222222	.664703	4.2	3.1	5.3
1	6.183784	.4781408	6.1	5.2	6.9
2	8.691667	1.32205	8.55	6.7	12.3
3	13.37692	3.334229	12.4	10.2	24.5
4	29.925	11.81055	27.85	18	46
Total	9.247059	4.973375	8.35	3.1	46

Dunn's Pairwise Comparison of stiffness by ffibrosan
(Bonferroni)

Col Mean-Row Mean	0	1	2	3
1	-1.974171 0.2418			
2	-6.380310 0.0000	-5.507493 0.0000		
3	-9.663075 0.0000	-9.526008 0.0000	-5.392455 0.0000	
4	-5.805616 0.0000	-5.019353 0.0000	-2.974133 0.0147	-0.867938 1.0000

С 4, 3, 2, 1 и 0 са означени съответно подгрупите с четвърти, трети, втори, първи стадий и без фиброза. ffibroscan – степен на фиброза, оценена чрез stiffness – плътност от Фиброскан, Тестът на Дупп открива, че приетите в настоящото проучване cut-off стойности (норма до 5 – 5,5 кРа, стадий F1 – до 7 кРа, стадий F2 – 7,5 до 10 кРа, стадий F3 – 10 до 14 кРа, стадий F4 >14 кРа) разграничават с високо ниво на статистическа значимост всички подгрупи с фиброза с изключение на 4 спрямо 3 стадий ($p=1.000$), и 1 стадий спрямо болните без фиброза ($p=0.2418$).

Рангова корелация на Spearman е използвана, за да се изчисли асоциацията на фиброзата, която е определена чрез FibroScan, с анализираните номинални клинични и лабораторни фактори. Тестът показва наличие на статистически значима връзка на фиброзата със следните фактори: артериална хипертония, АСАТ (отклонение от нормата) и пикочна киселина. Корелационната зависимост на фиброзата с артериалната хипертония и повишените стойности на АСАТ и пикочна киселина е слаба, тъй като корелационният коефициент на Spearman е със стойности под 0.3.

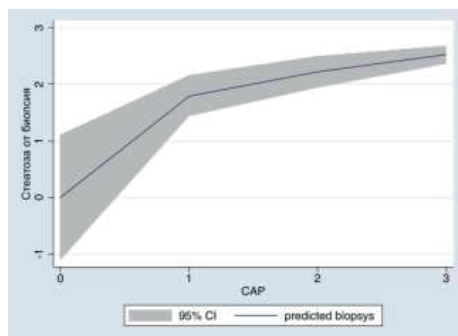
Таблица 18. Резултати от рангова корелация на Spearman за установяване на статистически значима асоциация на чернодробната фиброза с номинални клинични и лабораторни фактори

Показатели	Spearman's ρ	N	P-value
Клинични			
Пол	– 0.0898	170	0.2440
Артериална хипертония	0.1971	170	0.0100
Захарен диабет	– 0.1305	170	0.0898
Метаболитен синдром	0.0498	170	0.5191
Тютюнопушене	– 0.0501	170	0.5162
Лабораторни			
Трансферин (отклонение от нормата)	– 0.0033	80	0.9771

Желязо (отклонение от нормата)	- 0.0732	170	0.3431
Феритин (отклонение от нормата)	0.1656	119	0.0719
Тромбоцити (отклонение от нормата)	0.0756	170	0.3269
АЛАТ (отклонение от нормата)	0.1477	170	0.0546
АСАТ (отклонение от нормата)	0.2311	170	0.0024
ГГТ (отклонение от нормата)	0.0917	170	0.2343
Триглицериди (отклонение от нормата)	- 0.0067	170	0.9307
Пикочна киселина (отклонение от нормата)	0.2849	91	0.0062

2.4. Сравнение на резултати от FibroScan и чернодробна биопсия

Рангова корелация на Spearman е използвана също така, за да се определи асоциацията на стеатоза и фиброзата, които са измерени чрез FibroScan, и съответно, диагностицирани чрез чернодробна биопсия. Установява се статистически значима корелация между двата метода на изследване като силата на корелационната зависимост е умерена. По отношение на стеатозата има положителна корелация ($p=0.3000$, $p=0.0005$).



Фигура 52. Графиката представя резултат от рангова корелация на Spearman. Синята линия разкрива корелацията между случаите с първа, втора и трета степен на стеатоза, които са диагностицирани с неинвазивен метод (CAP на Фиброскан) срещу хистологично изследване на чернодробна биопсия. Графиката демонстрира монотонна връзка между двата метода. Сивата лента показва графично зададената степен на достоверност (95%).

Данните са подложени на допълнителен **корелационен анализ чрез хи-квадрат тест:**

Таблица 19. Корелационен анализ - сравнение на стеатоза, измерена с Фиброскан и стеатоза, оценена хистологично

BiopsySteatosis / Steatosis_Fibroscan Crosstabulation

		Steatosis_Fibroscan				Total
		0	1	2	3	
BiopsyS0	Count	2	0	0	2	4
	% within Steatosis_Fibroscan	100,0%	0,0%	0,0%	1,9%	3,0%
	1 Count	0	5	5	14	24
	% within Steatosis_Fibroscan	0,0%	50,0%	27,8%	13,3%	17,8%
2	Count	0	2	4	16	22
	% within Steatosis_Fibroscan	0,0%	20,0%	22,2%	15,2%	16,3%
3	Count	0	3	9	73	85
	% within Steatosis_Fibroscan	0,0%	30,0%	50,0%	69,5%	63,0%
Total	Count	2	10	18	105	135
	% within Steatosis_Fibroscan	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	78,214 ^a	9	,000
Likelihood Ratio	26,083	9	,002
Linear-by-Linear Association	17,875	1	,000
N of Valid Cases	135		

Correlations

		Steatosis_F ibroscan	Biopsy S
Steatosis_Fibros can	Pearson Correlation	1	,365**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	170	135
BiopsyS	Pearson Correlation	,365**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	135	135

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

			Steatosis_F ibroscan	Biopsy S
Kendall's tau_b	Steatosis_Fibros can	Correlation Coefficient	1,000	,277**
		Sig. (2-tailed)	.	,001
		N	170	135
	BiopsyS	Correlation Coefficient	,277**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,001	.
		N	135	135

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

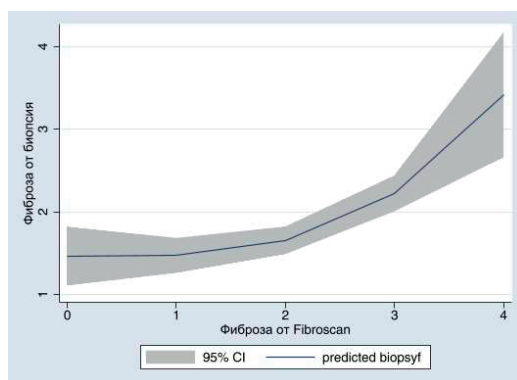
При сравняването на резултатите от Fibroscan и чернодробна биопсия за наличие на стеатоза първата таблица показва процентното разпределение, както следва:

- при резултат 0 от Fibroscan 100% са с резултат 0 от чернодробна биопсия;
- при резултат 1 от Fibroscan 50% са с резултат 1, 20% с 2 и 30% с резултат 3 от чернодробна биопсия;
- при резултат 2 от Fibroscan 28% са с резултат 1, 22% с 2 и 50% са с резултат 3 от чернодробна биопсия;
- при резултат 3 от Fibroscan 2% са с резултат 0, 13% с 1, 15% с 2 и 70% са с резултат 3 от чернодробна биопсия.

С тест **Chi-Square** се установява статистически значима връзка между резултатите от Fibroscan и хистологичен резултат от чернодробна биопсия, анализирана в хистопатологичната лаборатория (**Pearson $\chi^2(9)=78.214$, $p<0.0001$**) – анализът е направен върху 135 участника, за които има всички данни.

Таблиците (correlations) потвърждават наличието на умерена корелация между данните за стеатоза от Fibroscan и чернодробна биопсия, анализирана в патологична лаборатория – **Pearson Correlation, Correlation coefficient ($r=0.37$), $p<0.0001$.**

За фиброзата, която е диагностицирана чрез FibroScan и биопсия, също се установява положителна корелация ($\rho=0.3779$, $p<0.0001$).



Фигура 53. Графиката представя резултат от рангова корелация на Spearman. Синята линия разкрива корелацията между случаите с първа, втора, трета и

четвърта степен на фиброза, които са диагностицирани с измерване на плътността на черния дроб (Фиброскан) срещу хистологично изследване на чернодробна биопсия. Демонстрирана е монотонна връзка между двата метода. Сивата лента показва графично зададената степен на достоверност (95%).

2.5. Предсказващ модел за чернодробна стеатоза и фиброза (метод на LASSO)

Всички фактори, които са без липсващи данни за болните (N=170), бяха включени в линеарен модел на LASSO. Болните са разделени в две равни групи, както следва:

група 1 – за определяне на предсказващи модели, съответно за чернодробна стеатоза и фиброза, и,

група 2 – за оценка на пригодността на статистическите модели в набор от наблюдения.

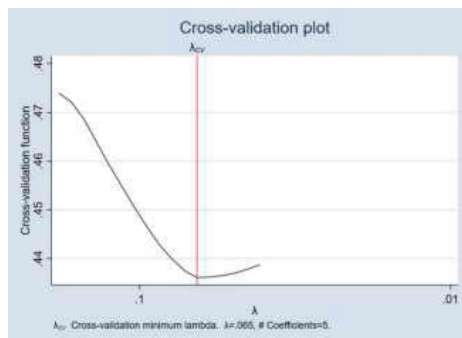
2.5.1. Модел за неинвазивно определяне на чернодробна стеатоза чрез транзитна еластография

В група 1, LASSO методът изпробва 17 модела с различни комбинации на ковариати. Модел под номер 12 с λ -коэффициент=0.0654448 е избран чрез кръстосано валидиране и включва 5 ковариати:

Таблица 20. Изчисления за избор на Lasso линеарен модел за стеатоза чрез кръстосано валидиране.

Lasso linear model			No. of obs	=	170
			No. of covariates	=	20
Selection: Cross-validation			No. of CV folds	=	10
ID	Description	lambda	No. of nonzero coef.	Out-of- sample R-squared	CV mean prediction error
1	first lambda	.1821041	0	0.0085	.4739238
11	lambda before	.0718256	5	0.0689	.4375599
* 12	selected lambda	.0654448	5	0.0719	.4361356
13	lambda after	.0596309	5	0.0718	.4362115
17	last lambda	.0411012	8	0.0663	.4387575

* lambda selected by cross-validation.



Фигура 54. Функция на кръстосано валидиране при използване на Lasso метод. Функцията е минимизирана когато $\lambda=0.065$.

По-надолу е представена таблица с информация за моделите, които са годни за тестване във втората група:

Таблица 21. Изчисления за минимален BIC при диагностичен модел на стеатоза.

BIC (Bayesian Information Criterion) оценява вероятността за това дали определен фактор е част от модела. Представява еквивалент на статистическата значимост за ефекта на количествените и категориални променливи.

`. lassoknots, display (nonzero csr2 bic)`

ID	lambda	No. of nonzero coef.	Out-of- sample R-squared	BIC
2	.1659264	1	-0.0046	362.2827
4	.137755	2	0.0128	363.7569
7	.1042066	4	0.0411	366.9968
11	.0718256	5	0.0689	362.0588
* 12	.0654448	5	0.0719	360.0582
14	.0543334	6	0.0711	362.0611
16	.0451086	7	0.0693	364.4907
17	.0411012	8	0.0663	368.1695

* lambda selected by cross-validation.

BIC оценява моделите въз основа на всички възможни комбинации на независимите променливи фактори. Модел под номер 12 се оказва с най-нисък BIC.

Чрез приложение на адаптивен LASSO метод се установява моделът с минималната осреднена предсказваща грешка на кръстосано валидиране (CV mean prediction error= 0.1811064):

Адаптивният LASSO метод разкрива 4 фактора, които имат предсказваща стойност за неинвазивно определяне на чернодробна стеатоза, а именно: серумно желязо, триглицериди, CAP и пол.

Таблица 22. Фактори с предсказваща стойност за неинвазивно определяне на чернодробна стеатоза.

```
. lassocoeff cv minBIC adaptive, sort(coef, standardized) nofvlabel
```

	cv	minBIC	adaptive
bmi	x	x	
iron	x	x	x
trigl	x	x	x
asatgr	x	x	
height	x	x	
cap			x
sex			x
_cons	x	x	x

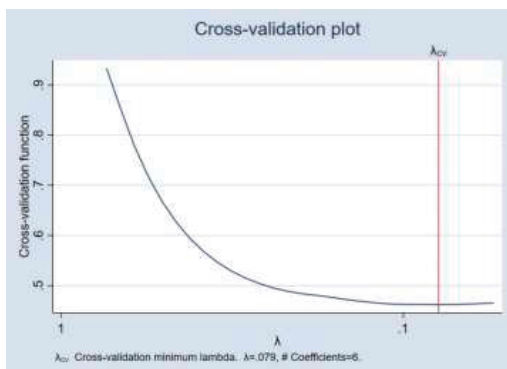
Legend:
b - base level
e - empty cell
o - omitted
x - estimated

В най-горната част на таблицата са посочени факторите с най-големите стандартизирани коефициенти. В най-дясната част на таблицата са посочени факторите с предсказваща стойност чрез използване на адаптивен Lasso метод. Това са повишен ASAT, BMI, CAP.

Прави впечатление, че при използване на LASSO с кръстосано валидиране (CV) и минимален BIC, в предсказващия модел се включват и следните фактори: BMI, повишени стойности на ACAT, ръст. Но те отпадат при приложение на адаптивен LASSO метод. Още повече, при оценка на пригодността на статистическия модел в група 2 се установява, че най-ниска стойност на средната квадратична грешка (MSE)= .1301091 и най-висока стойност на коефициента на детерминация $R^2= 0.5139$ са изчислени чрез адаптивния LASSO метод.

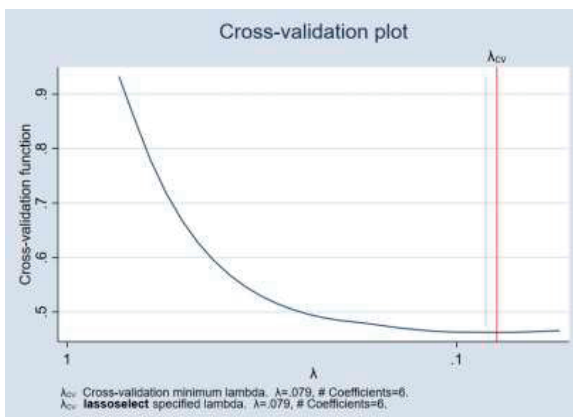
2.5.2. Модел за неинвазивно определяне на чернодробна фиброза чрез транзитентна еластография

В група 1, LASSO методът изпробва 29 модела с различни стойности на λ -коефициент. Модел под номер 25 с $\lambda=0.0789555$ има най-добра предсказваща стойност:



Фигура 55. Функция на кръстосано валидиране при използване на Lasso метод. Функцията е минимизирана когато $\lambda=0.079$.

Графиката потвърждава, че функцията на кръстосано валидиране е минимизирана когато $\lambda=0.079$.



Фигура 56. Функция на кръстосано валидиране и избор на Lasso модел с минимален BIC. Функцията е минимизирана когато $\lambda=0.065$.

Чрез приложение на адаптивен LASSO метод се установява моделът с минималната осреднена предсказваща грешка на кръстосано валидиране (CV mean prediction error= 0.460909):

Адаптивният LASSO метод разкрива 11 фактора, които имат предсказваща стойност за неинвазивно определяне на чернодробна фиброза,

а именно: чернодробна плътност (Фиброскан), САР (Фиброскан), FIB-4, понижени стойности на тромбоцитите, повишен АСАТ, възраст, повишена ГГТ, телесно тегло, повишени триглицериди, повишен АЛАТ, холестерол.

Таблица 23. Фактори с предсказваща стойност за неинвазивно определяне на чернодробна фиброза.

```
. lassocoeff cv minBIC adaptive, sort(coef, standardized) nofvlabel
```

	cv	minBIC	adaptive
stiffness	x	x	x
cap	x	x	x
fib4	x	x	
thr	x	x	x
asatgr	x	x	x
age	x	x	x
gsgr			x
weight			x
triglgr			x
thrgr			x
alatgr			x
chol			x
_cons	x	x	x

Legend:
b - base level
e - empty cell
o - omitted
x - estimated

В най-горната част на таблицата са посочени факторите с най-големите стандартизирани коефициенти. В най-дясната част на таблицата са посочени факторите с предсказваща стойност чрез използване на адаптивен Lasso метод.

Stiffness, CAP, FIB-4, Тромбоцити

2.5.3 Обобщение относно диагностични модели за чернодробна стеатоза и фиброза

В настоящото проучване са създадени диагностични модели за неинвазивно определяне на чернодробна стеатоза и фиброза.

2.5.3.1. Чернодробна стеатоза

Въз основа на получения модел, чернодробната стеатоза може да бъде диагностицирана чрез комбинация от 4 фактора: САР, триглицериди, пол и серумно желязо. Трите стадия на стеатоза са разграничени чрез FibroScan като стойностите на САР са с високо ниво на статистическа значимост: $\chi^2(df3)=86.897$, $P=0.0001$ (непараметричен тест на Kruskal-Wallis). Нива на серумното желязо (16.0 срещу 12.1; $p=0.0087$) разграничават 3-ти стадий на стеатоза спрямо 1-ви стадий (тест на Dunn с Bonferroni корекция). Серумните стойности на триглицеридите и полът не са асоциирани

самостоятелно със стеатозата, но се включват в прогностичен модел при използване на адаптивен LASSO метод.

2.5.3.2. Чернодробна фиброза

Предсказващият модел за чернодробна фиброза, който е получен в проучването, включва следните фактори: чернодробна плътност (Фиброскан), САР (Фиброскан), понижени тромбоцити, повишен АСАТ, възраст, повишен ГГТ, телесно тегло, повишени триглицериди, повишен АЛАТ, холестерол. Четирите стадия на фиброза са разграничени чрез FibroScan и използване на показателя stiffness. Установява се много добро разграничаване на стадията на фиброза в изследваната група болни: стадий 1 – 6.18 ± 0.48 (медиана 6.1); стадий 2 – 8.60 ± 1.32 (медиана 8.55); стадий 3 – 13.4 ± 3.3 (медиана 12.4); стадий 4 – 29.9 ± 11.8 (медиана 27.8). По-ниски стойности на тромбоцитите се установяват в подгрупата с 3 стадий фиброза в сравнение с 1 стадий: 250 744 спрямо 303 027; $p=0.0102$. АСАТ е с повишени стойности в 3 стадий на фиброза в сравнение с 1 стадий, както и при болните без данни за фиброза, както следва: 54.7 спрямо 31.3; $p=0.0332$, и, 54.7 срещу 24.1; $p=0.0039$. Болните с 2 и 3 стадий на фиброза са значимо по-възрастни спрямо тези с 1 стадий, както следва: 53.3 срещу 46 години ($p=0.0226$), и 51.8 срещу 46 години ($p=0.0336$) при използване на тест на Dunn с Bonferroni корекция. Освен това, при 2 и 3 стадий на фиброза се установява по-високо телесно тегло (кг) в сравнение с болните без данни за фиброза: 98.6 срещу 83.9; $p=0.0237$ и 109.8 срещу 83.9; $p=0.0002$. Стойностите на АЛАТ са повишени в стадий 3 на фиброза в сравнение с болните без фиброза (74.5 срещу 34.7; $p=0.0074$).

ГГТ и триглицериди (отклонение от нормата) и серумните нива на холестерол не са пряко асоциирани с установяването на фиброза, но се включват в прогностичен модел при използване на адаптивен LASSO метод.

Средните стойностите на FIB-4 са значимо по-високи във 2 и 3 стадий на фиброза в сравнение с 1 стадий, както следва: 1.02 срещу 0.68; $p=0.0059$, и, 1.39 спрямо 0.68; $p<0.0001$.

Средните стойности на пикочната киселина са по-високи при 2, 3 и 4 стадий на фиброза в сравнение с болните без данни за фиброза. Резултатите са следните: за стадий 2 фиброза – 419.9 спрямо 255.4; $p=0.0043$. За стадий 3 фиброза – 412.3 срещу 255.4; $p=0.0128$, и, за стадий 4 фиброза – 455.3 спрямо 255.4; $p=0.0333$.

2.5.4. Обобщение относно диагностична стойност на Фиброскан

В настоящото проучване се установява статистически значима корелация между FibroScan и чернодробната биопсия за диагноза на чернодробна стеатоза и фиброза като силата на корелационната зависимост е умерена. По отношение на стеатозата има положителна рангова корелация на Spearman ($\rho=0.3000$, $p=0.0005$). За фиброзата, която е диагностицирана чрез FibroScan и биопсия, също се установява положителна корелация ($\rho=0.3779$, $p<0.0001$).

IV. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

В настоящия дисертационен труд е направен ретроспективен анализ на група пациенти с метаболитен синдром и неалкохолна стеатозна чернодробна болест в различен стадий – от обикновена стеатоза до неалкохолен стеатохепатит с фиброза до стадий на начална цироза. Сред пациентите няма случай с първичен чернодробен тумор, както и с декомпенсиран стадий на цироза. Извършена е комплексна оценка на състоянието на черния дроб чрез анализ на данните от лабораторни, образни и хистологични изследвания. Сравнени са резултатите от неинвазивно (чрез ехография, транзитентна еластография, магнитнорезонансна спектроскопия, кръвни показатели) и инвазивно (биопсично) изследване на черния дроб с използване на статистически методи.

Клиничната оценка на пациентите с NAFLD включва: анамнестични данни със субективна симптоматика, придружаващи заболявания, фамилна обремененост, количество и вид на консумирания алкохол, физикален статус с антропометрични показатели (ръст, тегло, BMI, обиколка на талията), лабораторни и образни изследвания, както и хистологичен резултат от биопсично изследване на черния дроб.

Пациентите с чернодробна стеатоза обикновено нямат изразени субективни оплаквания. Анамнестичните данни включват тежест или дискомфорт в дясно подребрие, чувство за подпиране, напълняване с подуване на корема.

Натрупаните данни показват, че измерването на талията, телесното тегло и ръста с определяне на BMI при всеки пациент е от особено значение, тъй като могат да насочат вниманието за наличен метаболитен синдром и чернодробно увреждане със стеатоза. Стойности на коремната обиколка над

80 за жените и над 94 за мъжете налагат допълнителни изследвания в тази насока, а рискът за по-напреднало чернодробно увреждане е още по-висок при стойности на BMI >30 и талия над 102 см за мъжете и над 88 см за жените. Два прости показателя като коремна обиколка и BMI могат да бъдат предиктори за налично чернодробно увреждане. Ето защо е важно да бъдат включени във физикалния статус на всеки пациент, а в рубриката вредни навици задължително да се описва количество, честота и вид на консумирания алкохол (за отдиференциране на алкохолен и неалкохолен стеатохепатит).

В изследваната група пациенти с нормално тегло са 0,2 %, с наднормено 21,8%, а със затлъстяване 77%, като преобладават пациентите с I степен затлъстяване. Налице е корелация и пряка зависимост между телесното тегло, BMI и обиколката на талията със степента на мастно натрупване в черния дроб.

Честа находка е артериалната хипертония - наблюдава се в 74,1% от пациентите в изследваната група.

Интересно е дали тютюнопушенето дава отражение върху появата и тежестта на чернодробната стеатоза и фиброза. По данни на СЗО, базирани на Евростат от 2017 г, разпространението на тютюнопушенето сред българското население е най-високо в Европейския съюз и е с почти 7% над средното за ЕС. Общо 28% от възрастното население в България пуши, като при мъжете всеки трети е пушач (средна честота 35% при мъжете). Има данни за повишена честота на ЗД тип 2 сред пушачите. В проучване при 4600 души в САЩ, проследени за период от 15 години, е установена двукратно повишена честота на ЗД сред пушачите в сравнение с непушачите. Счита се, че токсини в цигарения дим имат увреждащ ефект върху панкреаса като провокират окислителен стрес и така водят до потискане на инсулиновата секреция. А отделяните под влияние на никотина контраинсулинови хормони имат неблагоприятен ефект върху инсулиновата чувствителност. От друга страна, тютюнопушенето може да повлияе на хранителните навици, с прием на повече храна, алкохол и намалена двигателна активност, водещи до затлъстяване и метаболитни нарушения. В нашето проучване пушачите (бивши и настоящи) са 51,8%, съответно за мъжете 61,3%, при жените 43,3%, т.е. честотата е значително по-висока от средната за страната (28%).

При съмнение за NAFLD наборът от лабораторни тестове включва: АСАТ, АЛАТ, ГГТ, АФ, пикочна киселина, липиден профил, кръвна захар, HbA1c, НОМА-IR. Маркерите за В и С хепатит (съответно изследване на анти-НВс тотал, НВs Ag, анти-НСV) се пускат задължително изходно за отхвърляне на подлежаща вирусна генеза на чернодробното увреждане. Съчетанието от повишени ГГТ, пикочна киселина, триглицериди и кръвна захар насочват към метаболитен синдром и чернодробна стеатоза. Статистическият анализ показва, че случаите с напреднала фиброза имат повишена плътност от Фиброскан, намалени тромбоцити, повишени АСАТ и АЛАТ, напреднала възраст, по-високо тегло и BMI, повишена пикочна киселина и повишен FIB-4. Резултатите от изследванията подсказват, че нивото на триглицериди, холестерол и ГГТ имат отношение основно към чернодробната стеатоза и са по-слабо свързани със степента на фиброза.

В настоящото проучване сред пациентите с метаболитен синдром с повишен АСАТ са 37,6 % от изследваните пациенти, а с повишен АЛАТ – 45,3%, като преобладават пациентите с нормални чернодробни ензими. Но по-често (близо половината от пациентите – 50,6%) са с повишен ГГТ, което показва, че при метаболитно нарушение е по-характерно покачването на ГГТ, отколкото на трансаминазите. Същевременно нормалните чернодробни ензими не изключват подлежащо чернодробно увреждане. При почти всички пациенти (98,8%) стойностите на алкалната фосфатаза в серума са в референтни граници, само при 2 (1,2%) са малко над горната референтна граница, поради което измерването ѝ няма отношение към чернодробната стеатоза и фиброза, но служи за разграничаване от заболявания на жлъчните пътища с холестазата. Повишени триглицериди в серума са установени при 39,4% от изследваните пациенти, а понижен HDL при 58,8%.

С повишена пикочна киселина в серума са 60,4 % от изследваните пациенти. Пикочната киселина е продукт от разграждането на пурините с участието на ензим ксантинооксидаза в черния дроб, като нивото ѝ зависи от белтъчния прием и бъбречната екскреция. Редица изследвания показват, че хиперурикемията е свързана с метаболитния синдром и инсулиновата резистентост и може да е индикатор за ранна диагноза на метаболитен синдром. Затова е важно пикочната киселина да е включена в лабораторния панел при изследване на пациенти с чернодробен или метаболитен проблем.

Намаление на тромбоцитите се установява рядко (в 1,8 % от изследваните), само при пациенти в напреднал стадий на чернодробното увреждане, с фиброза 3 и 4-та степен и е свързано със спленомегалия при портална хипертония или намален синтез на тромбопоетин.

Повишен феритин установихме при 45,4 % от изследваните пациенти с метаболитен синдром. При това в 93% от тези пациенти серумното ниво на желязото е в референтни граници. Според някои автори повишеният феритин може да се приеме за маркер за напреднало метаболитно чернодробно увреждане.

Конвенционалното ехографско изследване дава качествена и полуколичествена оценка за наличие на чернодробна стеатоза, но когато тя засяга над 20% от чернодробния паренхим, т.е. в началните стадии не е показателно. Разграничаването на пациенти с обикновена стеатоза от тези с NASH и риск от прогресия и усложнения се постига чрез следните ехографски критерии: атенюация на ултразвук, огнищна стеатоза или fatty sparing, US - FLI ≥ 4 (т.е. наличие на fatty sparing, затруднена визуализация на стените на съдовете или на жлъчния мехур), скор на Zardi >5 , надлъжен размер на слезката над 116 мм, насочващ към начална портална хипертония. При пациентите с метаболитен синдром, включени в нашето проучване, ехографски са установени белези за стеатоза при всички, като преобладава умерената степен. Препоръчително е по-подробно описание на ехографския статус и наблюдение на находките, които имат значение за приемане на стеатохепатит.

За уточняване състоянието на черния дроб освен ехографското изследване като скрининг, според нас, следва да се въведе в рутинната практика транзиентната еластография с измерване на фиброзата и количествена оценка на стеатозата.

След направен анализ на голям брой изследвания при пациенти с NAFLD и NASH по света и предложените от различни авторски колективи стойности за диференциране на различните степени на чернодробната стеатоза, т.нар. cut off и на базата на натрупания личен опит от проведените изследвания и сравнения с хистологичната находка, създадохме валидни за нас собствени cut-off за ползване в ежедневната практика със следните стойности: Нормални стойности – S 0 – при CAP до 233 dB/m, S1 > 233 dB/m,

S2 > 270 dB/m, S3 > 300 dB/m. В изследваната група с метаболитен синдром 77,6% (132 болни) са диагностицирани с тежко изразена трета степен стеатоза (CAP 300 - 400 dB/m), 12,4% (21 болни) с втора степен (S2) и 8,8% (15 болни) с първа степен (S1). При двама от болните (1,2%) е открита S0. С помощта на Chi-Square Test се установява статистически значима връзка между оценката за стеатоза с Fibroscan и хистологичния резултат от чернодробна биопсия ($p < 0.0001$), което се потвърждава и с ранговата корелация на Spearman ($\rho = 0.3000$, $p = 0.0005$).

Чрез транзиентната еластография с апарат Фиброскан се измерва в килопаскали плътността на черния дроб, която отговаря на степента на чернодробната фиброза. Резултатите могат да варират от 1,5 до 75 kPa и се приема средната стойност от 10 валидни измервания. Трябва да се отбележи, че при последователни няколкократно измервания може да се получи различен резултат и средната стойност не се приема като абсолютна, строго фиксирана, а по-скоро ориентировъчна и насочваща към определена степен на фиброза. Известно е, че тези пределни стойности (cut-off) са различни при отделните нозологични единици (вирусен хепатит В, С, алкохолен хепатит, NAFLD), както и на базата на опита на различни колективи. Два метаанализа, включващи 19 проучвания и 2495 NAFLD пациенти предлагат за стадиране на фиброзата следните стойности – 6,6-7,8 kPa за F2, 7,1-10,4 kPa за F3 и 10,3-22,3 kPa за F4. [Error! Reference source not found.1] През последните години обобщени данни при пациенти с NAFLD и NASH са заложили следните критерии за оценка на фиброзата: F0/F1 – 2 до 7 kPa, F2 – 7,5 - 10 kPa, F3 – 10-14 kPa, F4 >14 kPa и в нашето проучване сме се придържали към тях. Относно фиброзата, която е диагностицирана чрез FibroScan и биопсия, ранговата корелация на Spearman установява положителна корелация със средна сила ($\rho = 0.3779$, $p < 0.0001$).

Редица автори приемат, че чернодробната биопсия дава най-прецизна оценка за състоянието на черния дроб. За да се постави диагноза NASH трябва да е наличен всеки от трите хистологични показатели- стеатоза, възпаление и балониране на хепатоцитите. Според нас SAF най-точно дефинира хистологичната картина и следва да се посочва в патоанатомичното заключение при всеки случай с чернодробна стеатоза. Инвазивността, рискът от усложнения, страхът от болка при процедурата, както и други фактори като вариабилност и субективност при разчитането, грешка на пробата, мозаичност на измененията, малка репрезентативност на

пробата, представляваща 1/50 000 от обема на черния дроб и др. ограничават извършването на биопсично изследване на черния дроб и дават предимство на неинвазивните методи. Тенденцията е постепенно да отпадне необходимостта от извършване на чернодробна биопсия и тя да остане само при трудни диагностични случаи.

Фиброзата определя тежестта на чернодробното увреждане, стадия на заболяването и прогресията до цироза и свързани с нея усложнения, ето защо е изключително важна прецизната ѝ оценка. Определянето е хистологично с чернодробна биопсия и неинвазивно чрез различните методи за ехографска еластография. Добра ориентация за тежестта на фиброзата дава и лабораторния скор FIB-4, базиран на стойностите на АСАТ, АЛАТ, тромбоцити и възрастта на пациента. Получените резултати при нашата група пациенти доказват надеждността на FIB-4 за отдиференциране на пациентите с напреднала фиброза и добрата корелация с резултатите от изследване с транзитна еластография и биопсия на черния дроб.

Магнитнорезонансната спектроскопия с PDFFF измерва общото количество мазнини в черния дроб, както и фиброзата с определяне на LIF скор, но е труднодостъпен поради висока цена и малък брой апарати. Успяхме да я приложим при 20 пациенти, като при 85% от изследваните болни се установява висок процент на отложени мазнини в черния дроб, средна стойност $17,65 \pm 10,83\%$ (мин. 3,2 % и макс. 31,8 %) при приета норма до 5,6% от теглото на черния дроб.

В настоящото проучване са създадени диагностични модели и алгоритъм за оценка на чернодробната стеатоза и фиброза.

Установена е предсказваща стойност за неинвазивно определяне на чернодробната стеатоза чрез комбинация от следните фактори: САР, триглицериди и серумно желязо. Приложените cut-off стойности на САР (за степен S1 – 233 dB/m, за степен S2 – 270 dB/m и за степен S3 – над 300 dB/m) разграничават с високо ниво на статистическа значимост ($p=0.001$) подгрупите с чернодробна стеатоза. Не се откриват статистически значими различия ($\chi^2(df3)= 2.688$; $p=0.442$) между трите групи със стеатоза по отношение на триглицеридите. Но, последните се включват в предсказващ диагностичен модел при приложение на адаптивен Lasso метод. В проучването са установени повишени стойности на триглицеридите при 67 от 170 болни (39,4%) като нормални нива са определени при 78 от 132

пациенти (59,1%) с изразена стеатоза S3, измерена с Фиброскан. Средните стойности на серумното желязо са по-високи в 3-ти стадий на стеатоза в сравнение с 1-ви стадий (16.0 срещу 12.1; $p=0.0087$). Това ни озадачи, а направената справка показва че, изследване на серумното желязо при пациенти с чернодробна стеатоза е извършено в малък брой проучвания по света. Проучване в Китай от Ма В. и колектив [4], публикувано през 03.2021 г., доказва, че чернодробната стеатоза е асоциирана с повишено серумно желязо при пациенти със затлъстяване. Авторите са изследвали 297 пациенти със затлъстяване и 43 здрави доброволци с нормален BMI. Установено е, че серумното желязо е сигнификантно по-високо при пациенти с наднормено тегло или затлъстяване, отколкото при тези с нормален BMI ($8,18 \pm 1,47$ срещу $7,46 \pm 0,99$, $p=0,002$), както и че е повишено при пациенти с АХ, дислипидемия или хиперурикемия ($p<0,05$). Освен това серумното желязо се покачва с нарастване на стеатозата и е сигнификантно по-високо при тежка в сравнение с умерена и лека форма на NAFLD ($p=0,046$ и $0,018$ съответно). Според тях нивото на серумното желязо е в позитивна връзка с телесното тегло, BMI, пикочна киселина, ниво на инсулина, HOMA-IR, триглицериди, свободни мастни киселини, висцерална мастна тъкан и чернодробна стеатоза, определена с CAP ($p<0,05$). Авторите отчитат намаляване както на CAP, така и на серумното желязо 6 до 12 месеца след бариатрична хирургия за затлъстяване при наблюдаваните пациенти. Те приемат, че нивото на серумното желязо е асоциирано с чернодробната стеатоза при затлъстяване. Според тях желязото индуцира оксидативен стрес в черния дроб с намаляване на дълговерижните полиненаситени мастни киселини и акумулиране на мазнини в чернодробните клетки, а също активира макрофагите и може да задейства процесите на възпаление и фиброгенеза при NAFLD.

Нашето проучване също доказва по-високи стойности на серумното желязо при тежко изразена 3-та степен стеатоза в сравнение с 1-ва степен стеатоза. Но, измерването с магнитнорезонансна спектроскопия на отложеното желязо в чернодробната тъкан не показва отклонение от нормата при изследваните 20 пациента с метаболитен синдром.

В нашето проучване се установява, че различните стадии на фиброза имат статистически значима разлика по отношение на следните показатели: възраст, BMI, тегло, обиколка на талията, АСАТ, АЛАТ, тромбоцити, пикочна киселина, FIB-4, CAP и плътност с транзитентна еластография, MRI, LIF score. Съответно не се открива статистически значима разлика при

различните стадии на фиброза по отношение на нивото на серумното желязо, феритин, трансферин, hsCRP, ГТТ, холестерол, LDL, HDL, триглицериди, HbA1c, както и количество на желязо в черния дроб. Болните с по-високо телесно тегло са с по-напреднала фиброза, както и тези с по-голяма обиколка на талията.

Неинвазивното определяне на чернодробна фиброза се предсказва чрез адаптивен Lasso метод в настоящото проучване чрез комбинация от 10 фактора: чернодробна плътност и CAP (Фиброскан), понижени тромбоцити, повишен АСАТ, възраст, повишен ГТТ, телесно тегло, повишени триглицериди, повишен АЛАТ, холестерол. Следните стойности за чернодробна плътност разграничават стадите на фиброза: стадий 1 – 6.18 ± 0.48 (медиана 6.1); стадий 2 – 8.60 ± 1.32 (медиана 8.55); стадий 3 – 13.4 ± 3.3 (медиана 12.4); стадий 4 – 29.9 ± 11.8 (медиана 27.8). За фиброзата, която е диагностицирана чрез FibroScan и биопсия се установява положителна корелация ($\rho=0.3779$, $p<0.0001$). Разграничаването на 3 от 1 стадий фиброза се постига статистически достоверно по следния начин: по-ниски стойности на тромбоцитите (250 744 спрямо 303 027; $p=0.0102$); повишени стойности на АСАТ (54.7 спрямо 31.3; $p=0.0332$); по-голяма възраст (51.8 срещу 46 години; $p=0.0336$). Фактори за разграничаване на болни с 3 стадий фиброза от тези без фиброза са: телесното тегло (109.8 срещу 83.9 кг; $p=0.0002$) и повишените стойности на АЛАТ (74.5 срещу 34.7; $p=0.0074$). ГТТ и отклонение на триглицеридите от нормата и серумните нива на холестерол не са пряко асоциирани с установяването на фиброза в това проучване, но се включват в прогностичен модел при използване на адаптивен LASSO метод. Повишените средни стойности на FIB-4 и пикочна киселина са различни в 3-ти стадий фиброза спрямо болните без фиброза с високо ниво на статистическа значимост, макар и да не са включени в предсказващия модел. Изчислените стойности са, съответно: 1.39 спрямо 0.68 ($p<0.0001$) за FIB-4, и 412.3 срещу 255.4 ($p=0.0128$) за пикочна киселина.

В резултат на установените данни може убедено да твърдим, че при пациенти с доказан **метаболичен синдром** или захарен диабет тип 2 се налага задължително уточняване на състоянието на черния дроб и предлагаме следния диагностичен **алгоритъм**:

1. От **анамнезата** – уточняване на субективните оплаквания, придружаващи заболявания - АХ, подагра, съдови усложнения, вирусен хепатит, както и консумация на алкохол - вид и количество, измерване на количество чист

алкохол и брой пътиета седмично. По отношение на фамилната анамнеза задължително се уточнява обремененост за ЗД, чернодробни и съдови заболявания.

2. Антропометрични показатели – измерване на ръст, тегло, обиколка на талията, изчисление на BMI. Необходимо е определяне на степента на затлъстяване, както и дали има рискова обиколка на талията (над 80 см за жените, над 94 см за мъжете, със значително повишен риск за чернодробно и сърдечносъдово увреждане- талия над 88 см при жените, над 102 см при мъжете).

3. Лабораторни изследвания – АСАТ, АЛАТ, ГГТ, АФ, пикочна киселина, липиден профил, кръвна захар на гладно, НВА1с, хепатитни маркери - анти-НВс тотал, НВс Аг, анти-НСV.

4. Ехография на коремни органи (определяне на степен на стеатоза - лека, умерена, тежка; търсене на огнищна стеатоза, определяне на US - FLI, MFS).

5. Транзиентна еластография (Фиброскан) с оценка на CAP за стеатоза и плътност за налична фиброза.

6. Изчисление на FIB-4 и FAST score за отдиференциране на пациентите с напреднала фиброза и риск от прогресия.

Според нас не е необходимо извършване на чернодробна биопсия, защото с неинвазивните методи може да се оцени както стеатозата, така и фиброзата на черния дроб и да се стадира чернодробното увреждане. Важно е разграничаването на простата стеатоза от стеатохепатита, както и на началната от напредналата фиброза. Чернодробната фиброза се приема като ключов фактор, определящ прогнозата при всички хронични чернодробни заболявания, включително и NAFLD.

ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ NAFLD ПРИ МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ

(талия $\text{♀} > 80$, $\text{♂} > 94$, $\uparrow \text{TG}$, $\downarrow \text{HDL}$, $\uparrow \text{Glu}$, AX)



Фигура 57. Диагностичен алгоритъм за NAFLD при метаболитен синдром



Фигура 58. Диагностичен алгоритъм при чернодробен проблем (отклонение в чернодробните ензими или в ехографската находка)

От друга страна при всеки пациент с повишени чернодробни ензими или установено увеличение или омазняване на черния дроб следва да се търси причината и насочено да се изследва за метаболитно нарушение. За откриване на инсулинова резистентост, която е най-честата причина за чернодробна стеатоза, се изчислява НОМА - IR на базата на стойността на кръвната захар на гладно и нивото на инсулина в серума. Провежда се обременяване с глюкоза с изследване на инсулиновите нива и серумната глюкоза на първи и втори час. Задължително се извършва абдоминална ехография и транзитна еластография с Фиброскан. За разлика от другите еластографски методи, определящи фиброзата, при транзитната еластография може да се измери и стеатозата, което ѝ дава голямо предимство.

Диагностичният алгоритъм при чернодробен проблем (отклонение в чернодробните ензими или в ехографската находка), насочващ към дифузно паренхимно увреждане на черния дроб включва следните стъпки:

1. От анамнезата – уточняване на субективните оплаквания, придружаващи заболявания, консумация на алкохол - вид и количество, измерване на брой питиета седмично и количество чист алкохол. По отношение на фамилната анамнеза задължително се уточнява обремененост за ЗД, АХ, чернодробни заболявания.

2. Антропометрични показатели – измерване на ръст, тегло, обиколка на талията, изчисление на BMI, определяне на степента на затлъстяване.

3. Лабораторни изследвания:

- вирусологични изследвания (хепатитни маркери) – анти-НВс тотал, НВс Аг, анти-НСV, рядко EBV.

-АСАТ, АЛАТ, ГГТ, АФ, пикочна киселина, липиден профил, кръвна захар на гладно, НвА1с, ОГТТ с инсулинови нива, НОМА-IR, изчисление на FIB-4.

-имуноглобулини ИгГ, ИгА, ИгМ, автоантитела – антинуклеарни (АНА), антимитохондриални (АМА), антигладкомускулни (АГМА).

4. Ехография на коремни органи (размер, форма, контур, еластичност на черния дроб, определяне на степен на стеатоза – лека, умерена, тежка; търсене на огнищна стеатоза, определяне на US-FLI, MFS, измерване на вена порте, размери на слезката, оглед на жлъчен мехур и жлъчни пътища)

5. Транзитна еластография (Фиброскан) с оценка на САР за стеатоза и плътност за налична фиброза, изчисление на FAST score за отдиференциране на пациентите с напреднала фиброза и риск от прогресия.

Възможността за обратимост на процеса на мастна инфилтрация на черния дроб налага своевременно диагностициране на стеатозата с бързи и достъпни методи и предприемане на мерки за овладяването ѝ и предотвратяване на неблагоприятните

последници като прогресия на възпалението и фиброзата, формиране на цироза или преход в чернодробен рак.

В резултат на ширещата се епидемия от затлъстяване по света нараства честотата на чернодробната неалкохолна стеатозна болест, която застава във фокуса на хепатолозите като главна причина за повишени чернодробни ензими и хронично чернодробно увреждане. Чернодробната стеатоза най-често е последица на инсулиновата резистентност и метаболитния синдром, на стеатогенния ефект от алкохолната употреба или хронична хепатит С вирусна инфекция. NAFLD е манифестация на органно увреждане вследствие на метаболитен синдром. По литературни данни NAFLD е на път да изпревари останалите чернодробни заболявания по заболяемост, смъртност и като показание за чернодробна трансплантация. Стеатозата е кофактор за прогресия на фиброзата при хронични вирусни хепатити, затруднено възстановяване след чернодробни резекции или повишен риск за графта след чернодробна трансплантация. NAFLD е независим предиктор за поява на сърдечносъдови заболявания, неоплазми и повишена смъртност по различни причини. Това налага необходимостта от използване на достъпни методи за определяне на количеството мазнини в черния дроб. Чернодробната биопсия все още е златен стандарт в диагностиката, оценяваща наличието и тежестта на стеатозата, както и за откриване на агресивната форма на NAFLD, известна като NASH с белези за възпаление, балониране на хепатоцитите и различна степен на фиброза. Известно е, че тежестта на фиброзата определя прогнозата и риска от усложнения при хронично чернодробно заболяване.

Чернодробната биопсия обаче е инвазивен метод, свързан макар и рядко с усложнения, разход на средства и не може да се ползва масово за скрининг на населението за стеатоза, както и за периодично мониториране на състоянието. Необходим е достъпен, безопасен и достатъчно прецизен метод за откриване на стеатозата и количествената ѝ преценка, с възможност за многократно извършване и проследяване в хода на диета, промяна в начина на живот и терапевтичен режим; да е real time и с получаване на бърз резултат с оглед вземане на своевременно медицинско решение. Най-широко използваните образни методи- ехографията и ехографската еластография покриват тези изисквания.

Транзиентната еластография с апарат Фиброскан се утвърждава като стандарт в ежедневната практика във водещите гастроентерологични клиники по света. Тя дава възможност едновременно да се определи както степента на мастна инфилтрация, така и плътността на органа, отговаряща на тежестта на фиброзата, която е важен критерий за прогнозата и прогресията на чернодробното заболяване. CAP (controlled attenuation parameter) дава отговор има ли прекомерно отлагане на мазнини и в каква степен. CAP измерванията корелират със степента на стеатозата независимо от подлежащото чернодробно заболяване. Този метод е лесно изпълним, неболезнен, безвреден, базиран на ултразвуковия метод и може да се прилага многократно при проследяване на пациентите със затлъстяване или чернодробни проблеми. Изследването доказва висока степен на корелация и статистическа значимост при сравнение на измерванията с транзиентна еластография с хистологичния резултат от чернодробна биопсия ($p < 0,001$) и може в комбинация с други лабораторни и антропометрични показатели да служи за

модел за оценка на стеатозата и да измести необходимостта от извършване на чернодробна биопсия.

Във връзка с голямата честота на разпространение на NAFLD е наложително при всеки пациент със затлъстяване, захарен диабет или предиабет да се прилага съответен алгоритъм за поведение, включващ извършване на ехографско изследване, транзитна еластография с Фиброскан за оценка на стеатоза, фиброза, тежест на чернодробното увреждане, както и определен минимум лабораторни изследвания- АСАТ, АЛАТ, ГГТ, липиди, пикочна киселина, НВА1с.

Същевременно всеки пациент с регистриран чернодробен проблем- повишени чернодробни ензими, ехографска находка за стеатоза, насочено да се изследва за нарушения във въглехидратната обмяна, наличие на инсулинова резистентност, фамилна обремененост, извършване на ОГТТ, изследване на НВА1с, липиди.

Антропометричните данни – тегло, ръст, BMI, обиколка на талията могат да ни насочат бързо към подлежащо метаболитно нарушение. Затова е задължително да ги имаме предвид и с това да започва всеки физикален преглед на пациент с чернодробен проблем или да стане навик в ежедневната практика, независимо от вида на заболяването.

Съгласно световните ръководни препоръки:

➤ при установяване на чернодробна стеатоза пациентите трябва да се оценят за метаболитни рискови фактори като затлъстяване, дислипидемия, нарушен глюкозен толеранс или ЗД, хипотиреоидизъм, овариална поликистоза, както и за алтернативни причини за чернодробна стеатоза като значителна консумация на алкохол или прием на медикаменти.

➤ пациентите със ЗД тип 2 са твърде suspectни за NAFLD и NASH и следва да се оценят с NFS, FIB-4 или VCTE (транзитна еластография) по отношение на риска за напреднала фиброза.

➤ скоростите системи NFS, FIB-4 и FAST score (FibroScan-AST) са полезни инструменти за идентифициране на пациентите с NAFLD и висока вероятност за напреднала фиброза- F3, F4.

Рутинното извършване на транзитна еластография с CAP в ежедневната практика ще спомогне за своевременно откриване на NAFLD и предприемане на необходимите мерки за корекция на нарушението.

V. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ

1. Транзиентната еластография е надежден метод за неинвазивно откриване и количествено измерване на чернодробната стеатоза, едновременно с определяне на наличие на фиброза и стадирането ѝ. В настоящото проучване се установява **статистически значима корелация между FibroScan и хистологичното изследване** при чернодробна биопсия за диагноза на чернодробна стеатоза и фиброза като силата на корелационната зависимост е умерена. За стеатозата е налице Pearson корелация с Correlation coefficient $r=0.37$, $p<0.0001$, както и положителна рангова корелация на Spearman ($\rho=0.3000$, $p=0.0005$). За фиброзата също се установява положителна корелация ($\rho=0.3779$, $p<0.0001$).

2. **Транзиентната еластография** с едновременно измерване на плътността и количествена оценка на мастната инфилтрация на черния дроб се утвърждава като **рутинен метод** при изследване на пациенти с метаболитен синдром, ЗД, затлъстяване, както и при пациенти с отклонение в чернодробните ензими. Тя може да измести извършването на чернодробна биопсия в голям процент от случаите и е подходяща като неинвазивен метод за периодично проследяване (мониториране) на състоянието на черния дроб в хода на терапевтично повлияване.

3. **FIB-4 и транзиентната еластография** са достатъчни за преценка на степента на **фиброза** при чернодробно увреждане.

4. **Антропометричните показатели**- като телесно тегло, ръст, BMI, обиколка на талията са високо информативни и насочващи за наличие метаболитно нарушение и чернодробна стеатоза и следва да се измерват при всеки пациент.

5. Нормалните стойности на **чернодробните ензими** не отхвърлят наличие на чернодробно увреждане.

6. При пациентите с чернодробна стеатоза и/или неалкохолен стеатохепатит (NASH) **не се открива отлагане на желязо в черния дроб**, стойностите на трансферин са нормални, серумното желязо обичайно е в референтни граници и покачване на феритин и високочувствителен CRP се установява в неголям процент от случаите, като корелира с по-изразена възпалителна активност и сърдечно-съдов риск.

7. При хистологични данни за чернодробна стеатоза се препоръчва на патолозите използване на утвърдената **скорова система SAF**, включваща три компонента- S-стеатоза (0-3), A- активност (0-4), на базата на точки за балониране на хепатоцитите (0-2) и лобуларно възпаление (0-2) и F- фиброза (0-4), за по-прецизна оценка на хистологичната находка при стеатохепатит. SAF най-точно дефинира хистологичната картина и следва да се посочва в патоанатомичното заключение при всеки случай с чернодробна стеатоза.

8. С неинвазивни методи – Фиброскан, ехографско изследване, серумни маркери може да се разграничи проста стеатоза от неалкохолен стеатохепатит.

9. **FAST score** (на базата на измерване на фиброза и стеатоза с Фиброскан и ACAT) може успешно да отдиференцира пациентите с повишен риск от прогресия и усложнения от NASH.

VI. ПРИНОСИ (според дисертанта)

С потвърдителен характер:

1. Потвърждава се **значението на неинвазивните методи** за оценка на чернодробната стеатоза (включващи прецизно ехографско изследване, транзиентна еластография, серумни маркери и скорове- липиден профил, кръвна захар, инсулин, HOMA-IR, ACAT, АЛАТ, ГГТ, пикочна киселина, Стеатотест, NASH тест, FibroMax, Fatty Liver Index и др.)
2. Въвежда се **транзиентната еластография** с Фиброскан- CAP за измерване на стеатозата едновременно с определяне на плътността (фиброзата), като **рутинен задължителен метод** при изследване на пациенти с чернодробно увреждане, както и при всички пациенти със ЗД или затлъстяване. С прилагането на неинвазивните методи може да се избегне извършването на чернодробна биопсия в голям % от случаите, както и периодично да се следи състоянието на черния дроб в хода на терапевтичния режим, което да мотивира пациентите за постигане на по-добри резултати.
3. Изтъква се значението на **антропометричните показатели**- ръст, тегло, BMI, обиколка на талията, като бързи ориентири за подлежащо метаболитно нарушение и чернодробно увреждане.
4. **Прецизирането на ехографското изследване** включва определяне на степента на стеатозата- лека, умерена и тежка, с оценка на ултразвуковата атенуация, зони на огнищна стеатоза или лишени от стеатоза, определяне на US-FLI (Ultrasound fatty liver index) и MFS (Modified fatty score).
5. Потвърждава се важността на неинвазивната оценка на **чернодробната фиброза** като показател за прогресия на чернодробното увреждане, определящ прогнозата и риска от усложнения. Като основни методи за измерването ѝ се приемат еластография на черния дроб, FIB-4, NFS (NAFLD Fibrosis score).
6. Въвежда се използването на **FAST score** за бързо отдиференциране на случаите с напреднала фиброза и активност на NASH.

С оригинален характер

1. Създаден е **алгоритъм** за изследване състоянието на черния дроб **при пациенти с метаболитен синдром, ЗД или затлъстяване.**
2. Създаден е клиничен **алгоритъм** за поведение при пациенти с **чернодробен проблем (отклонение в чернодробните ензими или ехографската находка).**
3. Създадени са **собствени cut off** (пределни стойности) за стадиране на чернодробната стеатоза на базата на измерване с CAP на Фиброскан.

VII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, свързани с темата на дисертационния труд

1. Цонев Р, Стоянова К, **Балабанска Р**, Аргирова Р, Дечева А. Фиброскан в ежедневната практика. Национална конференция по гастроентерология с международно участие, 2-4 юни 2016 г, Варна

2. Комитова Т, Митова Р, Генев Й, Григоров Н, Алексиев А, Попов Д, Ханджиев С, Цонев Р, **Балабанска Р**, Иванова И. Национални правила и препоръки за провеждане на ултразвукова еластография на черен дроб. Диагностичен и терапевтичен ултразвук. Vol.28, №1, 2020

3. **Балабанска Р**. Чернодробна стеатоза и какво е стеатохепатит. Medical magazine. брой 86/ 03.2021 год., 78-81

4. **Балабанска Р**. Как да разберем имаме ли стеатоза на черния дроб? GP news. Брой 4 (250), април 2021 год., 22-28

5. Vassilev M, **Balabanska R**, Andonova S, Tzvetanska A, Tzonev R, Savov A. The minor IL28B SNP RS8099917 allele frequency is increased in a cohort of chronic liver disease patients as compared to the general population. Hepatology, Volume 54, number 4 (Suppl.), October, 2011, poster 1770, page 299, p.1195A

6. Lawitz E, **Balabanska R**, Charles E, Friedman S, Gutierrez J, Niitsu Y, Poordad F, Sanyal A, Tanaka Y, Thienel U, Ying W, Maruyama K. Clinical Phase 1b/2 study results for safety, pharmacokinetics, and efficacy of ND-L02-s0201, a Novel Targeted Lipid nonparticle (LNP) delivering HSP47 siRNA for the treatment of patients with advanced liver fibrosis. Poster 432, Hepatology, Oct 2017, p.159A

БЛАГОДАРЯ

на всички, които допринесоха този труд да се осъществи:

-На **Проф. Симеон Стойнов**, дмн, моя научен ръководител, който няколко години не се отказваше да ме убеждава да се захвана с научен труд и ме подкрепяше и напътстваше през целия период на съвместната ни работа

-На моето семейство: съпругът ми **Проф.Тошо Балабански** за безценната помощ със статистическата обработка и редакция на дисертационния труд, на **децата ми- Елена и Любомир**, майка ми **Елена** и сестра ми **Проф.Цветалина Танкова** за вдъхновяващата обич и подкрепа

-На колегите от **Клиниката по Гастроентерология** за оказаното съдействие

-На **Стоян Атанасов** за прецизните графики

-На **Проф. Татяна Иванова** за огромната и всеотдайна методична помощ при подготовката на настоящия труд