

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
DIN CRAIOVA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ



TEZĂ DE DOCTORAT  
-REZUMAT-

*Importanța metodelor de diagnostic non-  
invaziv în evaluarea pacienților cu ficat  
gras non-alcoolic*

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,  
Prof. Univ. Dr. TUDOREL CIUREA

DOCTORAND,  
ANCA-MARIA AMZOLINI

CRAIOVA  
2012



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSURU



Fondul Social European  
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TINERETULUI  
ȘI SPORTULUI

OIPOSURU



UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE CRAIOVA

**Investește în oameni !**  
**FONDUL SOCIAL EUROPEAN**  
**Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor**  
**Umane 2007 – 2013**

**Axa prioritară 1**  
**„Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii**  
**economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

**Domeniul major de intervenție 1.5**  
**„Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”**

**Titlul proiectului**  
**"Dezvoltarea școlilor doctorale prin acordarea de burse**  
**tinerilor doctoranzi cu frecvență"**

**Contract nr: POSDRU/88/1.5/S/52826**

**Beneficiar**  
**Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova**

## CUPRINS

Introducere.....	4
Partea generală.....	5
Contribuții proprii.....	6
• Rolul testelor non-invazive în diagnosticul pacienților cu ficat gras non-alcoolic.....	7
• Rolul elastometriei impulsionale (FibroScan) în evaluarea pacienților cu ficat gras non-alcoolic.....	8
• Determinarea polimorfismelor genelor PNPLA3, MTP și MnSOD și semnificația acestora la pacienții cu ficat gras non-alcoolic.....	9
• Rolul antigenelor HLA în determinarea susceptibilității la boală a pacienților cu steatoză hepatică non alcoolică.....	10
Bibliografie selectivă.....	11

### ***Cuvinte cheie***

Ficat gras non-alcoolic (NAFLD), steatohepatită (NASH), fibroză hepatică, biopsie hepatică, diagnostic non-invaziv, scoruri non-invazive, FibroScan, polimorfisme gene (SNP), antigene HLA

## *INTRODUCERE*

Ficatul gras non-alcoolic este considerat în prezent o problemă majoră de sănătate publică în întreaga lume. Obezitatea, diabetul zaharat tip II și dislipidemia, în absența consumului de alcool, constituie cei mai importanți factori de risc pentru ficatul gras non-alcoolic, aspect relevat de o serie de studii epidemiologice care au arătat independent o puternică legătură între fiecare factor menționat și boală.

Ficatul gras non-alcoolic cuprinde mai multe entități clinice, plecând de la steatoză hepatică și ajungând la steatohepatită, fibroză și chiar ciroză hepatică, aspecte care necesită confirmare histologică.

În prezent se acordă o mare importanță studiului metodelor non-invazive de diagnostic, cu scopul identificării unor tehnici imagistice și a unor markeri serologici care să se coreleze cu leziunile de steatohepatită și fibroză hepatică, precum și pentru stabilirea unor indicații clare ale biopsiei hepatice la pacienții cu ficat gras non-alcoolic.

Markerii serologici predictivi pentru fibroza hepatică și testele non-invazive propuse ca alternativă la efectuarea biopsiei hepatice și a examenului histologic nu au fost unanim acceptate și foarte puține sunt validate în prezent.

Argumentele expuse susțin cercetările științifice privind explorarea non-invazivă a ficatului gras non-alcoolic, pentru identificarea pacienților care prezintă risc înalt de a dezvolta o formă mai agresivă de boală și pentru elaborarea unui algoritm de evaluare a gradului și stadiului afecțiunii.

## PARTEA GENERALĂ

Primul capitol din partea generală, intitulat *DEFINIȚIA FICATULUI GRAS NON-ALCOOLIC*, trece în revistă terminologia utilizată pentru leziunile hepatice care caracterizează ficatul gras non-alcoolic, steatoza, steatohepatita și fibroza hepatică, precum și ultimele criterii de diagnostic pentru sindromul metabolic.

În capitolul II, *EPIDEMIOLOGIE ȘI ETIOPATOGENEZĂ*, sunt prezentate date actuale privind incidența și prevalența ficatului gras non-alcoolic, date legate de factorii de risc și principalele condiții clinice asociate cu ficatul gras non-alcoolic. Incidența și prevalența reală a ficatului gras non-alcoolic nu sunt pe deplin cunoscute, dar datele existente până în prezent indică o creștere rapidă a prevalenței afecțiunii paralel cu creșterea dramatică a populației cu obezitate și diabet zaharat. Principalii factori de risc asociați cu ficatul gras non-alcoolic sunt reprezentați de obezitate, diabet zaharat, sindrom metabolic, având insulinorezistența ca mecanism patogenetic principal. Tot în acest capitol sunt trecute în revistă principalele mecanisme patogenice care duc la apariția și la evoluția leziunilor de steatoză hepatică până la stadiul de fibroză. Capitolul se încheie cu date legate de implicarea factorilor genetici în dezvoltarea ficatului gras non-alcoolic.

În capitolele III și IV, *DIAGNOSTIC CLINIC* și *DIAGNOSTIC PARACLINIC* sunt prezentate principalele manifestări clinice ale pacienților cu ficat gras non-alcoolic,

precum și principalele modificări biologice și imagistice care susțin diagnosticul de steatoză hepatică non-alcoolică.

Capitolul V, *DIAGNOSTIC HISTOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC*, cuprinde date privind caracteristicile anatomopatologice ale leziunilor de steatoză, steatohepatită și fibroză, precum și sistemele actuale de clasificare și de evaluare a stadiului și gradului bolii la pacienții cu ficat gras non-alcoolic.

Ultimul capitol al părții generale, *DIAGNOSTIC NON-INVAZIV*, urmărește principalele metode non-invazive (sistemele de scoruri și tehnicile imagistice) utilizate în prezent pentru diagnosticul ficatului gras non-alcoolic, insistând pe valoarea predictivă a acestora în decelarea modificărilor de steatoză, steatohepatită și fibroză hepatică comparativ cu modificările histologice corespunzătoare fiecărui tip de leziune.

### *CONTRIBUȚII PROPRII*

Studiul desfășurat în cadrul Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie Craiova, în perioada noiembrie 2009 - iunie 2012, a cuprins mai multe loturi, cu un număr semnificativ de pacienți (n=202), pe care am realizat analiza comparativă a metodelor clasice de diagnostic invaziv, a testelor non-invazive de diagnostic și a explorărilor de ultimă generație (măsurarea elasticității hepatice prin elastometrie impulsională- FibroScan și testele genetice cu determinarea polimorfismelor genelor PNPLA3, MTP și MnSOD și identificarea unor antigene HLA care conferă susceptibilitate la apariția bolii).

- ***Rolul testelor non-invazive în diagnosticul pacienților cu ficat gras non-alcoolic***

Efectuarea biopsiei hepatice la o parte din pacienți, a permis stabilirea cu mai mare acuratețe a rolului testelor non-invazive în diagnosticul leziunilor de steatoză, steatohepatită și fibroză hepatică.

Testele non-invazive analizate pe primul lot de studiu au arătat o corelație semnificativă statistic cu leziunile de steatoză, steatohepatită și fibroză hepatică evidențiate pe biopsiile hepatice. Dintre scorurile utilizate pentru stabilirea sau infirmarea diagnosticului de steatoză hepatică, am cercetat utilitatea *Fatty liver index* (FLI) și *NAFLD-liver fat score* (NAFLD-LFS). Pentru *Fatty liver index*, am obținut o acuratețe de 96% pentru excluderea steatozei prin  $FLI < 30$  (Se 95,83%, Sp 100%, VPP 100%, VPN 50%) și o acuratețe tot de 96% pentru confirmarea steatozei hepatice prin  $FLI \geq 60$  (Se 87,5%, Sp 100%, VPP 100%, VPN 25%). Pentru *NAFLD-liver fat score*, pentru pragul de -0,640, am obținut o sensibilitate de 95,83% și o specificitate de 100%, atunci când rezultatele au fost raportate la leziunile histologice de steatoză. Pentru scorurile de steatohepatită am obținut o acuratețe mai mică în diagnosticarea NASH, 60%, cu sensibilitate, specificitate, VPP și VPN de 80%, 40%, 60%, respectiv 57%. Rezultate promițătoare am obținut pentru *NAFLD fibrosis score*. O valoare a *NAFLD fibrosis score* sub -1,455 a exclus fibroza semnificativă cu o sensibilitate și VPN de 100%, iar o valoare peste 0,676 a confirmat fibroza avansată cu specificitate și VPP tot de 100%.

• ***Rolul elastometriei impulsionale (FibroScan) în evaluarea pacienților cu ficat gras non-alcoolic***

Măsurarea elasticității hepatice prin elastometrie impulsională (FibroScan) a fost propusă ca alternativă la efectuarea biopsiei hepatice pentru determinarea gradului fibrozei. Cercetarea de față concordă cu datele din literatură, cu o arie sub curba ROC de 0,823 (95%CI, 0,252-0,394) ( $p < 0,0001$ ) pentru excluderea fibrozei semnificative la o valoare măsurată sub 6,9kPa și cu o arie situată sub curba ROC de 0,95(95%CI, 0,426-0,475) ( $p < 0,0001$ ) la o valoare măsurată a elasticității hepatice peste 9,4kPa. Prin împărțirea lotului de pacienți cu rezultate valide la FibroScan în funcție de valorile elasticității, am constatat că cei mai mulți pacienți (74,48%) au avut rezultatul FibroScan sub 7,9 kPa și vârsta acestor pacienți a fost semnificativ mai mică decât a pacienților din celelalte două subploturi ( $p=0,021$ ). Diferența între prezența și absența sindromului metabolic și a diabetului zaharat, a fost de asemenea semnificativă statistic între pacienții din subploturile de mai sus. Pacienții cu elasticitate hepatică sub 7,9 kPa au avut IMC mediu  $31,87 \pm 7,19 \text{ Kg/m}^2$ , mai mic decât celelalte două categorii de pacienți, diferență semnificativă statistic ( $p=0,003$ ). Rezultate similare, cu diferențe semnificative statistic între cele trei subploturi, am obținut și prin compararea circumferinței abdominale, a indicelui de insulinorezistență, a trigliceridelor serice, a transaminazelor și a GGT. În schimb, nu am obținut diferențe semnificative statistic pentru valorile colesterolului seric ( $p=0,137$ ), HDL-colesterolului ( $p=0,627$ ) și nici pentru raportul GOT/GPT ( $p=0,171$ ).



• ***Determinarea polimorfismelor genelor PNPLA3, MTP și MnSOD și semnificația acestora la pacienții cu ficat gras non-alcoolic***

Pentru polimorfismul PNPLA3 rs738409 este asociat cu un risc crescut de steatoză hepatică, alela de risc pentru steatoza hepatică este alela minoră G. Pe lotul studiat, purtătorii genotipului [CG] prezintă un risc de 1,7 ori mai mare de a dezvolta steatoză hepatică, față de purtătorii genotipului [CC] OR1,768 (95%CI, 1,006-3,110) (p=0,046).

Frecvența alelelor [G] și [T] pentru polimorfismul MTP rs1800591, ca și frecvența alelelor [T] și [C] pentru polimorfismul MnSOD 1183 T>C nu a prezentat diferențe între lotul de studiu și subiecții de control, arătând că pentru aceste polimorfisme nu s-au găsit asocieri semnificative cu steatoza hepatică. Polimorfismul PNPLA3 este asociat cu un risc crescut de steatoză hepatică la pacienții cu IMC<30 Kg/m<sup>2</sup>, față de populația de control, atunci când au fost comparați purtătorii alelei de risc [G] cu purtătorii alelei [C] (p=0,038). Prin compararea subplotului cu steatoză fără obezitate cu subplotul cu steatoză și IMC ≥30 Kg/m<sup>2</sup>, am observat că purtătorii alelei [G] față de homozigoții [CC] în model dominant, au un risc de 2,5 ori mai mare de a dezvolta steatoză hepatică (p=0,025). Pentru polimorfismul PNPLA3, alela de risc G este asociată semnificativ și cu riscul de fibroză severă (p=0,038), în special la pacienții cu IMC sub 35 Kg/m<sup>2</sup>. În privința polimorfismului MTP 493G/T rs1800591, nici unul dintre pacienții cu rezultate la FibroScan peste 8,7kPa, nu a fost purtător al genotipului TT. Totuși, purtătorii genotipului GT au un risc crescut de 2 ori de

evoluție spre stadii avansate ale fibrozei, comparativ cu populația de control.

• ***Rolul antigenelor HLA în determinarea susceptibilității la boală a pacienților cu steatoză hepatică non alcoolică***

În privința profilului HLA al pacienților cu NAFLD, am găsit două combinații de gene ce par a influența apariția bolii:

-HLA A24, HLA B15, HLA DR15/16 și HLA DQ 3/5 influențează dezvoltarea steatozei hepatice non-alcoolice la pacienții fără alți factori de risc

-HLA-A2, HLA-32, HLA B18, HLA B49 și HLA B53 la pacienții cu obezitate, sindrom metabolic și insulinorezistență

La finalizarea cercetării și după interpretarea rezultatelor am desprins 17 concluzii prezentate clar în ultimul capitol al tezei.

## **Bibliografie selectivă**

-Angulo P, M.D. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346(16): 1221-31

-Ciurea T, Pascu O, Stanciu C. Gastroenterologie și hepatologie. Actualități 2003, Ed. Medicală 2003:597-607; 777-793

-Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic Review: The Diagnosis and Staging of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Non-alcoholic Steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33(5):525-540

-Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ, and the NASH CRN4. The Association of Genetic Variability in Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 (PNPLA3) with Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2010; 52:894-903

-Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Saibara T, Hiroi M, Enzan H, Onishi S. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2004;40:781-6.

-Celikbilek M, Selcuk H, Yilmaz U. A new risk factor for the development of non-alcoholic fatty disease: HLA complex genes. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22(4):395-399

-Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease ( NAFLD ) and diagnostic

accuracy of non-invasive tests for liver disease severity *Annals of Medicine* , 2011 ; 43:617-649

-Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population *BMC Gastroenterology* 2006, 6:33

-Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, Lundbom N, Rissanen A, Ridderstråle M, Groop L, Orho-Melander M, Yki-Järvinen H. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors ; *Gastroenterology* 2009 ; 137:865-872

-Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD Fibrosis Score: A Noninvasive System That Identifies Liver Fibrosis in Patients with NAFLD *Hepatology* 2007; 45:846-854

-Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48:835-847.

-Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, Choi PC, Kowo M, Chan AW, Merrouche W, Sung JJ, de Lédinghen V. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51:454-62