

BOALA FICATULUI GRAS NON-ALCOOLIC. METODE NON-INVAZIVE DE DIAGNOSTIC.

Polina NAMOLOVAN – studentă anul VI, facultatea Medicină 1, **Eugen TCACIUC**¹ – dr. hab. șt. med., prof. univ.,
Elina BERLIBA¹ – dr. șt. med., conf. univ., **Svetlana ȚURCANU**¹ – dr. hab. șt. med., prof. univ.,
Ludmila TOFAN-SCUTARU¹ – dr. șt. med., conf. univ., **Adela ȚURCANU**¹ – dr. șt. med., conf. univ.,
Andrei MUNTEANU² – asist. univ., medic anatomopatolog, LAM Medexpert,
Diana BUGA¹ – doctorand, anul II, **Angela PELTEC**¹ – dr. șt. med., conf. univ.

¹Departamentul Medicină Internă, Disciplina gastroenterologie,

²Catedra de histologie, citologie și embriologie
IP USMF "Nicolae Testemițanu".

Rezumat. Boala ficatului gras non-alcoolic (BFGNA) este o cauză din ce în ce mai răspândită a afecțiunilor hepatice cronice și include o serie de boli, variind de la steatoza simplă la steatohepatita non-alcoolică (SHNA), fibroză, ciroză și eventual carcinomul hepatocelular. Este destul de dificil să suspectăm această boală la un stadiu precoce, având în vedere că majoritatea pacienților sunt aparent asimptomatici. Puncția biopsie hepatică (PBH) se consideră în continuare standardul de aur pentru diagnosticul BFGNA, dar limitările sale au făcut ca o mare parte a cercetărilor moderne să se direcționeze spre implementarea unor metode de diagnostic noi, neinvazive, care să asigure o cuantificare cât mai exactă a steatozei și fibrozei hepatice, și care să aibă o suficientă acuratețe, pentru a permite atât un diagnostic precis, cât și posibilitatea monitorizării evoluției hepatopatiei prin repetabilitate și reproductivitate. În această lucrare au fost evaluate unele metode neinvazive pentru diagnosticul steatozei simple, SHNA și BFGNA, incluzând atât indici serologici, cât și examinări imagistice. Metodele imagistice cuprind ultrasonografia, elastografia, tomografia computerizată și imagistica prin rezonanță magnetică (RMN), inclusiv modalitatea de a evalua densitatea protonică a fracției de grăsimi și RMN - spectroscopia. Unii biomarkeri serologici importanți, elucidați aici, sunt acidul hialuronic și laminina, citokeratina-18, biomarkerii respiratori, microARN-urile circulante, adipocitokinele, proteina transportoare a retinolului, rezistina, haptoglobina, proteina C-reactivă etc. Până în prezent, nici o metodă non-invazivă considerată separat nu are suficientă acuratețe pentru a permite înlocuirea biopsiei hepatice în diagnosticul de certitudine al BFGNA, dar utilizându-le în combinație, se poate reduce numărul de biopsii efectuate pentru stabilirea progresiei bolii.

Cuvinte-cheie: adipocitokine, biomarkeri neinvazivi, biopsia hepatică, boala ficatului gras non-alcoolică, elastografia, RMN-spectroscopia, steatoza hepatică, tomografie computerizată, ultrasonografia.

Summary. Non-alcoholic fatty liver disease. Non-invasive methods of diagnosis.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an increasingly reported cause of chronic liver disease and includes a number of diseases ranging from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma. It is quite difficult to suspect this disease, until it is too late, considering that the most of the patients are apparently asymptomatic. Liver biopsy is still the gold standard for the diagnosis of NAFLD, but it has some disadvantages, including the risk of complications. That is why a variety of studies suggests that due to the limitation and risk of biopsy, as well as improvement of the diagnostic accuracy of the new non-invasive methods, biopsy can no longer be considered obligatory. In this review several non-invasive markers have been evaluated for the diagnosis of simple steatosis, NASH and NAFLD, including both serological indices and imaging methods. The imaging modalities include ultrasonography with the extra edge of elastography, computed tomography, and magnetic resonance imaging including proton density fat fraction and spectroscopy to provide an estimation of hepatic fat content. Some important serological biomarkers, elucidated here are hyaluronic acid and laminin, caspase-cleaved cytokeratin-18, breath biomarkers, circulating microRNAs, adipocytokines, retinol binding protein, resistin, haptoglobin, C-reactive protein, etc. However, neither biomarkers nor biopsy alone is sufficient to establish an accurate diagnosis, none of these biomarkers is reliable alone, but by using them in combinations is possible to reduce the number of liver biopsy, effectuated to appreciate the progression stage of the disease.

Key-words: adipocytokines, computed tomography, hepatic steatosis, liver biopsy, MR-spectroscopy, non-alcoholic fatty liver disease, non-invasive biomarkers, sonoelastography, ultrasonography.

Резюме. Неалкогольная жировая болезнь печени. Неинвазивные методы диагностики.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является все более частой причиной хронических заболеваний печени и включает в себя ряд заболеваний, начиная от простого стеатоза до неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), фиброза, цирроза и, в конечном итоге, гепатоцеллюлярной карциномы. Это заболевание довольно трудно заподозрить вовремя, учитывая, что большинство пациентов, практически, бессимптомны. Биопсия печени, по-прежнему, остается золотым стандартом для диагностики НАЖБП, но имеет ряд недостатков, в том числе, и риск серьезных осложнений. Различные исследования показали, что из-за ограниченности и риска биопсии, а также благодаря возросшей точности новых не инвазивных методов диагностики, биопсия может больше не рас-

смагиваться как обязательная. В этой статье было исследовано и оценено несколько не инвазивных методов для диагностики простого стеатоза, НАСГ и НАЖБП, включая как серологические маркёры, так и методы лучевой визуализации. Методы лучевой диагностики включают ультразвуковое исследование, эластографию, компьютерную томографию и магнитно-резонансную томографию, в том числе, определяющую протонную плотность в доле жира, и спектроскопию для оценки содержания жира в печени. Наряду с вышеуказанными лучевыми методами, тут так же описаны и разъяснены некоторые важные серологические биомаркёры, включая гиалуроновую кислоту и ламинин, расщепленный каспазой цитокератин-18, биомаркёры дыхания, циркулирующие микроРНК, адипоцитокينات, ретинол-связывающий белок, резистин, гаптоглобин, С-реактивный белок и т.д. Однако, следует заметить, что ни отдельно взятого биомаркера, ни биопсии недостаточно для установления точного диагноза; ни один из этих методов не является надежным в отдельности, но их использование в комбинации способно уменьшить количество биопсий печени, производимых для оценки степени прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: адипоцитокينات, биопсия печени, компьютерная томография, МРТ-спектроскопия, неалкогольная жировая болезнь печени, неинвазивные биомаркеры, соноэластография, стеатоз печени, ультразвуковое исследование

Actualitatea temei

Boala ficatului gras non-alcoolic (BFGNA) cuprinde un spectru de leziuni hepatice (steatoză, steatohepatită non-alcoolică – SHNA, fibroză și ciroză) care apar în absența consumului de alcool sau consum minim (sub 20 g/zi pentru femei și 30 g/zi pentru bărbați) și în absența altor cauze evidente de boală hepatică [1]. BFGNA este cu siguranță cea mai frecventă cauză a bolii cronice de ficat. Se estimează că, la momentul actual, în lume există aproximativ 1 miliard de persoane care prezintă BFGNA. Numărul mare de studii care demonstrează asocierea ficatului gras non-alcoolic cu insulinorezistența, obezitatea, hipertensiunea arterială și dislipidemia, consideră BFGNA drept manifestarea hepatică a sindromului metabolic [5]. Indiferent de etiologia afecțiunilor hepatice cronice, evoluția la nivel celular este aceeași: inflamație, apoi necroză, vindecare (cu defect – fibroză), reparare extensivă (regenerare – cu evoluție spre ciroză), displazie și în cele din urmă hepatocarcinom. În practica curentă, în afecțiunile cronice hepatice evaluarea severității afecțiunii hepatice se face prin aprecierea gradului fibrozei și steatozei hepatice. Distanța certă dintre steatoza simplă și steatohepatită nu se poate realiza decât prin caracterizare morfologică hepatică. Deși puncția-biopsie hepatică (PBH) este considerată „standardul de aur” pentru diagnostic și stadializare, limitările sale au făcut ca o mare parte a cercetărilor moderne să se direcționeze spre implementarea unor metode noi de diagnostic, neinvazive, care să asigure o cuantificare cât mai exactă a steatozei și fibrozei hepatice, și care să aibă o suficientă acuratețe, pentru a permite atât un diagnostic precis, cât și posibilitatea monitorizării evoluției hepatopatiei prin repetabilitate și reproductivitate. Aceste metode combină o serie de parametri clinici și biochimici în sisteme de scoruri sau utilizează tehnici radiologice, căutând să îndeplinească cerințele unui marker non-invaziv ideal: cost-eficiență, ușurință în

măsurare, specificitate hepatică, reproductibilitate între pacienți și diferite grupuri populaționale, valoare predictivă. Există două mari grupuri de tehnici neinvazive de evaluare; prima este cea a „markerilor serici” și urmărește prezicerea stadiului steatozei și a altor determinanți ai afecțiunii hepatice (inflamația și fibroza) utilizând parametri serici măsurabili; cea de-a doua grupă este cea a tehnicilor imagistice.

Scopul acestei lucrări a fost analiza tuturor metodelor diagnostice existente la momentul actual, utile pentru evidențierea steatozei hepatice simple, steatohepatitei non-alcoolice și fibrozei hepatice în diferite stadii.

Diagnosticul BFGNA: metoda invazivă, biopsia hepatică

Biopsia hepatică este considerată încă drept „standardul de aur” în ceea ce privește aprecierea fibrozei și steatozei hepatice, însă s-a dovedit a fi un standard imperfect. Este o procedură invazivă, grevată de rare, dar posibile complicații, cum ar fi: durerea și disconfortul la locul biopsiei și în umăr (20%), leziunile organelor adiacente ficatului (intestinul subțire, colonul, colecistul, plămânul), peritonita biliară, hemoperitoneul, fistula arteriobiliară cu hemobilie, hipotensiunea. Fiind o metodă invazivă cu mortalitate raportată variabilă între 1/1000 și 1/10000, pacienții sunt adesea refractari la ideea de a efectua această manevră. Acuratețea rezultatelor biopsiei hepatice este pusă în discuție de mai multe studii. În majoritatea rapoartelor, criteriile minime pentru diagnosticul de BFGNA includ: prezența steatozei macrovesiculară care depășește 5%, infiltrarea cu celule inflamatorii (neutrofile și limfocite) a lobulilor, degenerarea balonica, corpusculi Mallory-Denk, fibroza pericelulară, fibroza sinusoidală, mitocondriile gigante, necroza eozinofilică și depunerea de fier. Cu toate acestea, limita majoră a puncției biopsie hepatice (PBH) este cantitatea mică de țesut analizat și, chiar în cazul fragmentelor mari, secțiunea hepatică,

reprezintă numai o mică fracțiune din țesutul hepatic (1/50 000), nefiind reprezentativă pentru parenchimul hepatic în totalitate. Multe studii au arătat că o singură biopsie hepatică poate subestima diagnosticul de BFGNA într-un procent de până la 50% [9]. Mai mult ca atât, sa demonstrat o pierdere semnificativă a acurateții diagnostice în cazul biopsiilor cu o lungime mai mică de 2 cm; dimensiunea mică a fragmentului biptic are tendința de a substadializa și subgrada diagnosticul histologic. Mai mult ca atât, erorile determinate de variabilitatea interpretării pot fi responsabile de rezultate false în 10% din biopsii [4]. Din aceste considerente, se poate afirma, că PBH, nu este o metodă nici suficientă, nici ideală pentru diagnosticul și stadializarea BFGNA.

Diagnosticul BFGNA: metode non-invasive radiologice

1. Ultrasonografia

Ultrasonografia (USG) este cea mai comună tehnică de imagistică utilizată pentru screening-ul BFGNA deoarece este una sigură, disponibilă și relativ ieftină. Gradul de infiltrare grasoasă este evaluat vizual prin gradul de echogenicitate. Steatoza apare prin prezența luminozității hepatice comparativ cu parenchimul rinichilor sau a splinei. Steatoza hepatică difuză este ușor și fidel diagnosticată prin prezența contrastului între parenchimul hepatic și corticala renală. Strălucirea hepatică este frecvent însoțită de „atenuare posterioară” și este explicată prin absorbția parțială de ultrasunete de către țesutul gras. Există o corelație directă între intensitatea încărcării hepatice grase și gradul de atenuare posterioară. Astfel, după intensitatea atenuării posterioare apreciem subiectiv, semicantitativ, steatoza ca fiind ușoară (atenuare discretă), moderată (atenuare evidentă) și severă (diafragma posterior greu vizibil sau chiar imposibil de vizualizat). Steatoza hepatică parcellară și „fatty-free areas” sunt situații particulare destul de frecvent întâlnite. Steatoza hepatică parcellară reprezintă o zonă hiperecogenă pe fondal de ficat normoecon. „Fatty-free areas” reprezintă o zonă hipoecogenă pe fondal a unui ficat hiperecogen steatozic. Delimitarea acestor zone este netă, adeseori cu contur geografic, iar dimensiunile variabile. Niciodată nu se modifică suprafața hepatică și nu infiltrază sau invadează structurile vasculare. O variantă des întâlnită de steatoză parcellară este „cuzinetul grăsos al hilului” - depunerea de grăsimi în exces într-o arie hepatică tipică, la bifurcația portală. Aspectul este de arie ovalară hiperecogenă, bine delimitată, de obicei de 3-4/2-3 cm, situată la bifurcația porții, între ramurile dreaptă și stângă ale acesteia [9].

Atunci când USG este comparată cu PBH la po-

pulația adultă, această tehnică are o sensibilitate variind de la 60% la 96% și o variație a specificității de la 84% la 100%. Când procentul de steatoză este de 20%, sensibilitatea și specificitatea cresc până la 100% și 90%, respectiv. Cu toate acestea, studiile au raportat o scădere a sensibilității atunci când conținutul de grăsime este <30%. Alte neajunsuri ale ecografiei sunt: dependența de operator și că nu distinge steatoza hepatică de fibroză.

2. Sonoelastografia. Fibroscan.

Sonoelastografia oferă o apreciere a rigidității hepatice, care la rândul ei, este influențată de inflamația grăsoasă, și include așa tehnici ca ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) și elastografia tranzitorie.

Metoda ARFI evaluează proprietățile elastice a regiunii anatomice a ficatului prin vizualizare în timp real în modul B ultrasonografic a zonei de interes. Metoda presupune măsurarea vitezei de propagare a undelor ultrasonografice în țesut, care se va modifica cu apariția infiltrației de grăsimi. Viteza normală pentru ficat este de 1 m/s. Această viteză scade odată ce există infiltrații grasoase [9].

În elastografia tranzitorie se apreciază rigiditatea țesutului hepatic (sau coeficientul de elasticitate) prin captarea ecourilor pulsatorii ce urmăresc propagarea undelor și măsurarea vitezei acestora. Cu cât țesutul este mai dur, cu atât mai rapid va fi propagat de undă [9]. Elastografia tranzitorie sau Fibroscan măsoară rigiditatea ficatului și în funcție de extindere a procesului inflamator hepatic imaginea elastografică se schimbă. Transductorul este localizat pe lobul drept al ficatului și obține fereastra de unde elastografice, apoi se selectează zona în care țesutul hepatic are o grosime de cel puțin 6 cm și este lipsit de vase sanguine mari. Standartizarea examinării se face prin măsurarea zonei mai jos de capsula hepatică cu adâncimea de 2 cm. Calcularea este apoi efectuată prin alegerea unei mărimi variind de la 15 la 20 mm, preferabil în zona centrală, având o suprafață de elasticitate relativ omogenă prezentată în culori diferite. Rigiditatea ficatului normal este cuprinsă între 6,5 și 7 kPa.

3. Tomografia computerizată

Tomografia computerizată abdominală (CT) produce o radiofrecvență diferită, în funcție de organul examinat individual. Măsurarea acestei radiolucente se numește unitatea Hounsfield (HU). În general, calibrarea imaginilor țesuturilor corporale este normalizată pe baza valorilor pentru: aer (-1000 HU), apă (0 HU) și densitate osoasă (+1 000 HU). Din evaluarea steatozei hepatice sa concluzionat că CT are o performanță foarte bună în diagnosticarea steatozelor $\geq 30\%$, cu specificitate 100% și sensibilitate de 82%. Pentru

determinarea gradului de steatoză sunt utilizate HU pentru ficat și splina. Ficatul, care are o valoare de 60 ± 10 HU, în mod normal, arată mai luminos decât splina, vasele sanguine sau tractul biliar, în timp ce grăsimile reprezintă o valoare de -90 HU. Creșterea acumulării de grăsimi în ficat poate duce la ceea, că HU hepatice vor fi mai mici decât HU splenice. În general, HU a ficatului ≤ 40 HU, sau diferența de densitate a ficatului minus diferența de densitate a splinei mai mică de -10 HU, sau raportul ficat/splina de $\leq 0,9$, permite stabilirea diagnosticului de steatoză hepatică.

Dual-energy CT (CT cu sursa dubla de energie) poate fi, de asemenea, utilizat pentru cuantificarea grăsimilor hepatice. Evaluarea compoziției țesuturilor este posibilă datorită diferenței în caracteristicile de atenuare a diferitelor substanțe. O diferență de atenuare a ficatului și a splinei de 10 HU este considerată normală. În steatoza hepatică este o scădere a atenuării hepatice. Aceasta presupune folosirea a două potențiale de tub - 80 și 140 kVp. Pe măsură ce potențialul tubului crește, atenuarea grăsimii crește. Studiile au constatat că o modificare a atenuării de >10 HU cu creșterea potențialului tubului de la 80 la 140 kVp sugerează o infiltrare cu grăsimi mai mare de 25%. Pentru fiecare caz, atenuarea hepatică este măsurată prin intermediul unei selecții random a regiunilor circulare de interes (RCI) a ambilor lobi. Pentru fiecare RCI, cea mai mare regiune posibilă este selectată prin evitarea zonelor cu structuri vasculare și biliare hepatice vizibile. RCI pot varia de la 200 la 400 mm². Indicele de atenuare a ficatului (liver attenuation index - LAI) este derivat din diferența dintre atenuarea hepatică medie și atenuarea medie a sângelui, și poate fi utilizat ca parametru pentru predicția gradului de steatoză macroveziculară.

Cu toate acestea, există și câteva dezavantaje a acestei metode: expunerea la radiații, HU pot diferi în dependență de setările mașinilor CT, iar HU pot fi schimbate din cauza a diverse afecțiuni, cum ar fi edeme asociate sau acumularea de cupru în ficat. CT nu este superioară ultrasonografiei în evaluarea steatozei hepatice, dar CT poate sugera valori cantitative și obiective în comparație cu ultrasonografia [6].

3. Rezonanța Magnetică Nucleară și RMN-PDFF

RMN este o examinare fără radiație ionizantă, care poate detecta steatoza hepatică chiar și în cantități microscopice. Se pot utiliza diferite tehnici precum CSI (chemical shift imaging), spectroscopia protonică și RMN-elastografia. Sensibilitatea și specificitatea CSI este de 90% și 91%, în timp ce spectroscopia este de 91% și respectiv 87% [17]. RMN-elastografia poate fi utilizată pentru măsurarea rigidității hepatice.

Cu toate acestea, RMN este o procedură relativ consumatoare de timp și costisitoare.

Recent, densitatea protonică a fracției de grăsime (magnetic resonance imaging proton density fat fraction - MRI-PDFF) a fost propusă ca un biomarker neinvaziv a steatozei hepatice [17]. Hidrogenul din grăsime este diferit în rezonanță de hidrogenul din apă. RMN-PDFF a fost utilizată pe scară largă pentru a estima nivelul trigliceridelor hepatice prin calcularea fracțiunii de trigliceride față de hidrogen în apă. Sensibilitatea și specificitatea RMN-PDFF care utilizează o tehnică multi-ecou pentru a estima cantitatea de grăsime intrahepatică este aproape perfectă. RMN-PDFF este cunoscut ca un standard de referință în domeniul radiologiei pentru a măsura cantitatea de grăsime hepatică [9].

Utilizarea clinică a fost aprobată de către Food and Drug Administration (FDA) din SUA, în care RMN-PDFF poate fi un substituent al biopsiei hepatice în studiile randomizate controlate care utilizează modificarea volumului grăsimilor hepatice ca variabilă primară. Cu toate acestea, unul din dezavantaje a metodei este prețul echipamentului și procedurii, este dificil pentru asistența medicală primară și alte facilități să utilizeze pe larg acest echipament costisitor. MRI-PDFF permite estimarea grăsimii hepatice aproape perfect, dar nu asigură diferențierea între SHNA și BFGNA [6].

4. RMN-spectroscopie protonică

Spectroscopia prin rezonanță magnetică permite demonstrarea concentrațiilor relative a metaboliților tisulari de-a lungul unui interval de două sau trei dimensiuni a spectrului, bazat pe fenomenul de modificare chimică. Produsele chimice și metaboliții au un spectru al intensității semnalului și a frecvenței lui, care este reprezentat în grafic. La RMN-spectroscopie protonică frecvența depinde de configurația protonilor din structura substanței chimice. Frecvența a apei la RMN-spectroscopia protonică *in vivo*, este utilizată ca standard de referință pentru identificarea diferitor produse chimice. Modificarea frecvenței sau a localizării substanțelor chimice în raport cu cea a apei permite generarea de informații calitative și cantitative despre substanțele chimice din țesuturi, formând baza caracterizării țesuturilor prin RMN-spectroscopie. RMN-spectroscopia se folosește pentru cuantificarea steatozei hepatice prin măsurarea peak-urilor (vârfurilor) de lipide în reprezentarea grafică. Cele mai folosite nuclee pentru spectroscopie sunt protonii (¹H), sodiul (²³Na) și fosforul (³¹P). Avantajele spectroscopiei cu ¹H sunt, ușurința de realizat, disponibilitatea largă și posibilitatea oferirii unui raport semnal-sunet (RSS) mult mai mare decât la ²³Na și

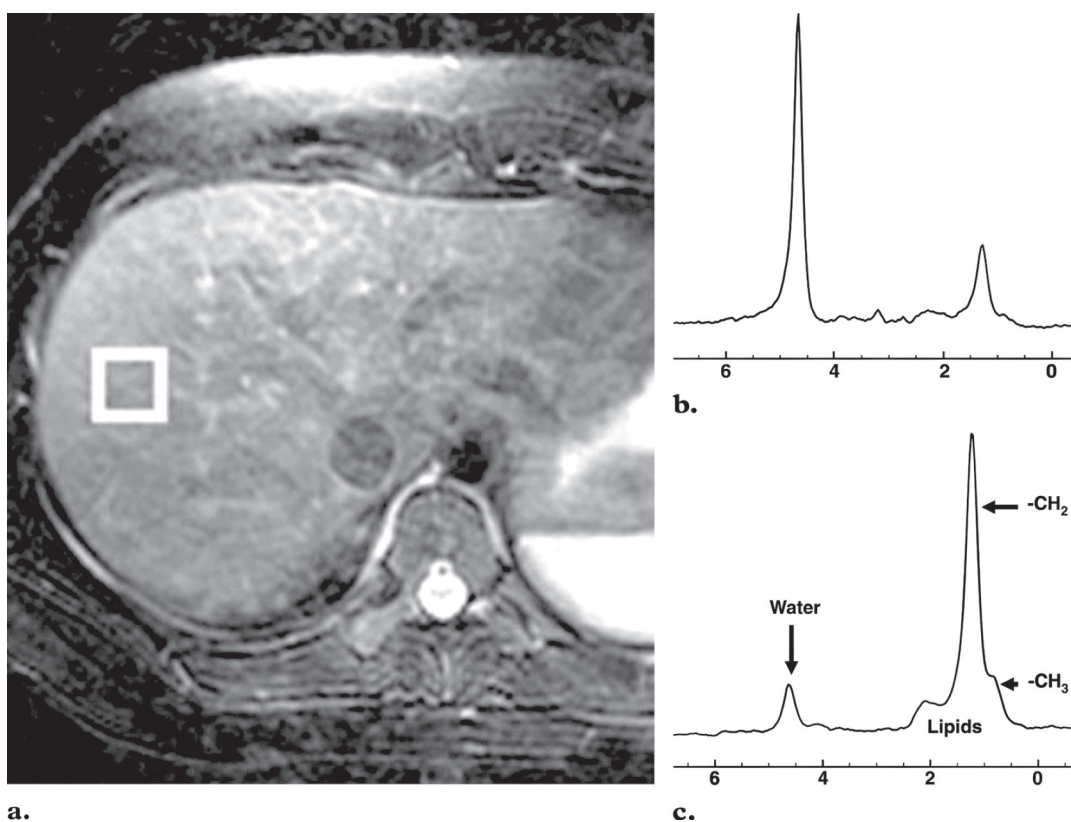


Fig. 1. RMN-spectroscopia protonică

(a) imaginea RMN; (b) spectrul ficatului de la un voluntar sănătos arată un peak lipidic mai mic comparativ cu cel al apei; (c) spectrul ficatului de la un pacient cu BFGNA prezintă un peak lipidic mai mare comparativ cu cel al apei (adaptat din [2]).

31P [13, 11]. ^1H RMN-spectroscopia sa dovedit a fi eficientă pentru cuantificarea grăsimilor hepatice [7]. Dimensiunea peak-urilor lipidice față de peak-ul apei crește cu gradul de steatoză.

RMN-spectroscopia are utilitate înaltă pentru evaluarea funcției metabolice, în special în ceea ce privește cuantificarea steatozei hepatice. De asemenea, poate furniza informații utile despre alte aspecte ale bolii hepatice (de exemplu, inflamație și fibroză). RMN prin spectroscopia protonică a ficatului este o tehnologie în evoluție cu potențial de îmbunătățire a acurateții diagnosticului și caracterizării țesuturilor modificate [2].

5. RMN-elastografie:

Elastografia prin rezonanță magnetică utilizează unde electromagnetice (cu interval 20-200 Hz) pentru a cerceta proprietățile mecanice ale țesuturilor [10]. Astfel de unde se propagă mai rapid în țesuturile rigide și mai lent în țesuturile moi. Dacă undele sunt aplicate în mod continuu, viteza de propagare se reflectă în lungimea de undă. Prin urmare, cu creșterea rigidității țesuturilor, lungimea de undă se mărește. Undele mecanice de înaltă frecvență sunt generate cu un sistem acustic special de conducere și sunt propa-

gate în corp. Propagare a undelor mecanice în ficat se înregistrează și apoi se procesează de un soft specializat (numit algoritm de inversare), care generează imagini cantitative transversale care demonstrează rigiditatea țesutului. După finalizarea procesului mecanic, imaginile de undă sunt prelucrate automat de scanner pentru a genera imagini care descriu rigiditatea țesutului - numite elastograme. Aceste imagini cantitative arată în mod tipic rigiditatea secțiunilor în unități de kilopascali (kPa) și pot fi afișate într-o scală gri sau de culoare [8]. La pacienții cu BFGNA steatoza desinestătătoare nu influențează semnificativ rigidității hepatice [18]. Dar prezența bolii hepatice inflamatorii (SHNA), provoacă creșterea rigidității hepatice evaluată prin RMN-elastografie crește chiar înainte de declanșare a fibrozei [3].

Diagnosticul BFGNA: metode non-invazive serologice

1. SteatoTest și Fatty Liver Index (FLI)

ST și FLI sunt markeri exacți și ușor de utilizat pentru diagnosticul de steatoză și au permis diferențierea între steatoza ușoară, moderată și severă. S-a constatat că ST și FLI sunt utile pentru discriminarea

între steatoza nesemnificativă (S0 şi S1) şi cea semnificativă (S2 şi S3).

FLI este un indice compus, care combină patru parametrii: indicele de masă corporală (IMC), circumferinţa abdominală, trigliceridele şi gama-glutamil transpeptidaza (GGTP) într-un algoritm matematic creat pentru a detecta prezenţa steatozei [16].

ST combină 10 componente sanguine: macroglobulină alfa-2 (g/l), haptoglobulină (g/l), apolipoproteină A (g/l), bilirubină totală ($\mu\text{mol/l}$), GGT (IU/l), alanin-aminotransferaza (ALT) (UI/l), aspartat-aminotransferaza (AST) (UI/L), colesterolul total (mmol/L), trigliceridele (mmol/l), glucoza ajeun (mmol/l) cu vârsta, sexul şi IMC. Scorul ST variază de la 0,00 la 1,00, cu valori mai mari indicând o probabilitate mai înaltă de leziuni semnificative.

ST şi FLI sunt metode precise şi uşoare în utilizare pentru diagnosticul de steatoză şi pentru diferenţierea între steatoza uşoară, moderată şi severă. Utilizarea complementară a ambelor metode ar putea îmbunătăţi precizia diagnosticului [16].

2. Acidul Hialuronic şi Laminina în fibroză

Valorile plasmatice ale acidului hialuronic (AH) şi ale lamininei (LN) cresc odată cu dezvoltarea fibrozei hepatice şi au putea fi utilizate ca biomarkeri neinvazivi pentru a deosebi pacienţii cu fibroză hepatică de indivizii sănătoşi. În fibroza hepatică se produc diferite componente a matricei extracelulare, cum ar fi LN, AH şi proteoglicani [16]. În ficat, AH este în cea mai mare parte sintetizată de celule stelate hepatice. Una dintre principalele glicoproteine ale membranei bazale este LN care este sintetizată de hepatocite şi celule sinusoidale. Celulele stelate produc cea mai mare cantitate de LN în ser. Pentru deosebirea pacienţilor cu fibroză hepatică de cei sănătoşi punctul de limită de 59,5 ng/ml AH şi 52,0 ng/ml LN; dar pentru deosebirea pacienţilor cu fibroză uşoară de cei cu fibroză severă a arătat o zonă acceptabilă de sensibilitate şi specificitate este 102,0 ng/ml AH şi 92,5 ng/ml LN.

3. Biomarkerii respiratori

Datele preliminare susţin utilizarea biomarkerilor respiratori în patologia hepatică, BFGNA [16]. Se constată că etanolul inspirat, etanolul şi acetona pot fi biomarkeri utili pentru pacienţii cu BFGNA. În particular, etanolul inspirat poate fi asociat cu steatoză hepatică, iar acetonele pot fi asociate cu SHNA. Disfuncţia mitocondrială joacă un rol central în patogenеза generală a BFGNA, crescând riscul de dezvoltare a steatozei şi inflamaţia hepatocelulară ulterioară. La pacienţii cu BFGNA funcţia mitocondrială hepatică este evaluată printr-un test neinvaziv de respiraţie

cu C-metionină. Mass-spectrometria prin rezonanţă magnetică a moleculei ionice (RMN-MS) îmbunătăţeşte exactitatea diagnosticului de analiză respiratorie în bolile hepatice. RMN-MS este un instrument promiţător pentru diagnosticul patologiei hepatice [16].

4. MicroARN-uri circulatorii

MicroARN-urile sunt ARN-uri mici necodificate, care controlează translaţia şi transcripţia a multor gene. Dereglările a microARN în bolile umane şi potenţialul acestora în calitate de ţinte în diagnostic explică atenţia sporită privind aceste structuri. Datorită stabilităţii şi prezenţei lor în aproape toate lichidele corporale, microARN-urile constituie o nouă clasă de biomarkeri neinvazivi [16]. Nivelurile serice ale microARN-urilor miR-34a şi miR-122 prezintă noi biomarkeri neinvazivi în diagnosticul şi evaluarea severităţii histologice a bolii la pacienţii cu BFGNA. MiR-122 specific ficatului prezintă un interes deosebit, deoarece este cunoscut pentru reglarea căilor metabolice în ficat, inclusiv biosinteza colesterolului. Nivelurile circulatorii ale acestor microARN-uri se corelează cu severitatea histologice a bolii hepatice la pacienţii cu BFGNA şi pot servi drept markeri circulanţi pentru evaluarea stadiului bolii.

5. Profilul plasmatic proteomic prin marcarea izotopului N-terminal

Proteomica este utilizată pentru a determina expresia şi dinamica a mai multor proteine şi se potriveşte în special pentru explorarea biomarkerilor bolii. Tehnicile proteomice cantitative bazate pe marcarea izotopilor stabili sunt aplicate din ce în ce mai mult în studiile biomarkerilor [16]. Tehnica de marcarea a izotopului acetil N-terminal prezintă un mare potenţial în detectarea biomarkerului, fiind şi o procedură simplă. Această metodă se foloseşte pentru a detecta stadializarea fibrozei hepatice. Un total de 72 de proteine plasmatice s-au dovedit a fi dereglate în timpul procesului de fibrogenеза şi aceşti biomarkeri reprezentat un depozit semnificativ care va fi analizat în viitor. Proteomica cantitativă prin tehnica de marcarea izotopică N-terminală a acetilului furnizează un instrument eficient şi util pentru screening-ul biomarkerilor candidaţi din plasma pentru fibroza hepatică [16].

6. Adipocitokinele

Adipocitokinele sunt exprimate în mod predominant în ţesutul adipos şi secretate în circulaţia sanguină. Principalele adipocitokine sunt adiponectina şi leptina. Adiponectina scade gluconeogeneza hepatică şi creşte utilizarea periferică a glucozei şi acizilor graşi liberi de către muşchi. Concentraţii

mici ale acestei citokine au fost observate în obezitate, rezistența la insulină și BFGNA. Adiponectina se presupune a avea, de asemenea, proprietăți anti-inflamatorii, iar administrarea sa la modelele animale a redus steatoza ca și markerii inflamației hepatice [15]. Leptina, o altă citokină produsă de țesutul adipos, împreună cu receptorii ei funcționali pot juca un rol important în fibrogeneza hepatică, efect probabil mediat de activarea celulelor stelate hepatice. Valorile circulante ale leptinei la pacienți cu SHNA sunt predictorii independenți de severitate a steatozei hepatice. Leptina crește atât răspunsul proinflamator cât și răspunsul profibrogenic hepatic prin up-reglarea TGF β (transforming growth factor beta) – una din citokinele-cheie ale reparației tisulare și fibrogenezei hepatice [16].

7. Proteina transportoare a retinolului (Retinol binding protein (RBP-4))

RBP-4 este o adipokină nou-identificată regăsită în principal în țesutul adipos, în cadrul patogenezei sindromului metabolic (rezistența la insulină), precum și în BFGNA. Nivelurile scăzute de RBP-4 au fost asociate cu creșterea nivelurilor de trigliceride serice. Nivelurile ridicate de RBP-4 au fost asociate cu o activitate necroinflamatoare scăzută, cu un scor scăzut al activității BFGNA și un scor scăzut de fibroză. Mai mult ca atât, nivelurile serice ale RBP-4 scad semnificativ pe măsură ce crește severitatea bolii. Astfel, există o relație inversă între nivelurile RBP-4 și gradul de afectare hepatică. RBP-4, prin urmare, ar putea fi un marker potențial nou neinvaziv de apreciere a severității BFGNA [16].

8. Rezistina

Rezistina este un agent proinflamator potent care determină rezistență la insulină printre pacienții cu diabet zaharat de tip 2. Niveluri mari de rezistină și TNF α (tumor necrosis factor alfa), care stimulează celulele hepatice stelate, inducând în mod direct fibroza hepatică, sunt descoperite la pacienții cu SHNA. Studiile anterioare au arătat că expresia rezistinei este detectabilă în țesutul hepatic și este indusă de leziuni cronice, ceea ce permite utilizarea rezistinei ca indicator al severității în BFGNA [16].

9. Nivele serice a CK18 M30

Apoptoza hepatocitelor este o trăsătură esențială a steatohepatitei non-alcoolice. În timpul apoptozei în unele celule are loc activarea caspazei generatoare de fragmente decitokeratină-18 (CK-18), care este crescută la nivel hepatic. Citokeratina-18, sintetizată în timpul reacțiilor inflamatorii mediate de caspaza-3 este un marker util în SHNA. În plus, pare a fi

o puternică legătură între activitatea apoptotică din SHNA și gradele de inflamație și fibroză [16]. Pornind de la toate aceste aspecte, în ultima decadă tot mai multe studii au sugerat posibilitatea utilizării markerilor serologici de activare a caspazei ca metodă de diferențiere a steatozei simple de SHNA [16]. Pentru evaluarea biomarkerului CK18 se utilizează o combinație de ELISA apoptosensibilă M30 și M65, care este un test inventat pentru detectarea citokeratinei-18. Nivelurile CK18 M30 au fost semnificativ mai mari la pacienții cu BFGNA comparativ cu grupa de control; acest marker este capabil să diferențieze gradul severității în steatoza simplă, fibroză și în ciroză.

10. Haptoglobina (Hp) și proteina C-reactiva (PCR)

Hp în plasma sanguină se leagă de hemoglobina eliberată din eritrocite cu afinitate ridicată și astfel inhibă activitatea oxidantă. PCR este o proteină găsită în sânge, nivelurile cărei cresc ca răspuns la inflamație. Rolul său fiziologic este de a se lega de fosfocolina aflată pe suprafața celulelor moarte sau în proces de moarte. PCR este sintetizată de ficat, ca răspuns la factorii eliberați de adipocite [16]. Elevarea a PCR și denevilarea a Hp sunt asociate cu BFGNA. Evaluarea Western-Blot a validat faptul că PCR este dramatic mai mare în serul pacienților cu BFGNA comparativ cu cohorta sănătoasă.

Până în prezent, nici o metodă non-invazivă considerată separat nu are suficientă acuratețe pentru a permite înlocuirea biopsiei hepatice în diagnosticul de certitudine al BFGNA, dar utilizându-le în combinație, se poate reduce numărul de biopsii efectuate pentru stabilirea progresiei bolii.

Bibliografia

1. Alba L.M., Lindor K. *Review article: nonalcoholic fatty liver disease*. Aliment Pharmacol Ther. 2003, 17, p. 977-986.
2. Aliya Qayyum. *MR Spectroscopy of the Liver: Principles and Clinical Applications*, MBBS, MRCP, FRCR, RadioGraphics. 2009.
3. Chen J., Talwalkar J.A., Yin M., Glaser K.J., Sanderson S.O., Ehman R.L. *Early Detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography*. Radiology. 2011, 259, p. 749–756. [PubMed: 21460032]
4. Carmen Fierbințeanu-Braticevici. *Evaluarea fibrozei hepatice: rolul biopsiei hepatice și al testelor neinvazive*. Clinica Medicală II - Gastroenterologie, Spitalul Universitar București, 2009.
5. de Alwis NMW, Day C.P. *Non-alcoholic fatty liver disease: The mist gradually clears*. J Hepatol. 2008, 48, p. 104-112.

6. Divya Singh, Chandan J. Das, Manas P. Baruah. *Imaging of non alcoholic fatty liver disease: A road less travelled. Department of Radiology.* All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, Department of Endocrinology, Excel Center, Guwahati, Assam, India, 2013.
7. Longo R., Pollesello P., Ricci C. et al. *Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis.* J Magn Reson Imaging. 1995, 5, p. 281–285.
8. Manduca A., Lake D., Kruse S., Ehman R. *Spatio-temporal directional filtering for improved inversion of MR elastography images.* Med Image Anal. 2003, 7, p. 465–473. [PubMed: 14561551]
9. Mimi Kim, Bo-Kyeong Kang, Dae Won Jun. *Comparison of conventional sonographic signs and magnetic resonance imaging proton density fat fraction for assessment of hepatic steatosis.* Scientific Reports volume. 2018, 8, p. 7759.
10. Muthupillai R., Lomas D., Rossman P., Greenleaf J., Manduca A., Ehman R. *Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves.* Science. 1995, 269, p. 1854–1857. [PubMed: 7569924]
11. Pagani E., Bizzi A., Di Salle F., De Stefano N., Filippi M. *Basic concepts of advanced MRI technique.* Neurol Sci. 2008, 29, p. 290–295.
12. Piccinino F., Sagnelli E., Pasquale G., Giusti G. *Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies.* J Hepatol. 1986, 2, p. 165–173.
13. Ross B.D., Colletti P., Lin A. *MR spectroscopy of the brain: neurospectroscopy.* In: Edelman RR, Hesselink JR, Zlatkin MB, Cruess JV, eds. Clinical magnetic resonance imaging. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders-Elsevier, 2006, p. 1840–1910.
14. Roxana Şirli, Ioan Sporea. *Curs deecografie abdominală pentru studenţi,* 2016.
15. Silha J.V., Krsek M., Skrha J.V., Sucharda P., Nyomba B.L., Murphy L.J. *Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: Correlations with insulin resistance.* Eur J Endocrinol. 2003, 149(4), p. 331–5.
16. Surendra H. Bodakhe, Sanjay Kumar Gupta. *Diagnostic methods for non-alcoholic fatty liver diseases alternative to liver biopsy: a review.* Department of Pharmacology, Institute of Pharmaceutical Sciences, Guru Ghasidas Vishwavidyalaya, Bilaspur, Chhattisgarh - 495 001, India. 2015, 8(2).
17. van Werven J.R., Marsman H.A., Nederveen A.J., Smits N.J., Ten Kate F.J., van Gulik T.M. et al. *Assessment of hepatic steatosis in patients undergoing liver resection: Comparison of US, CT, T1-weighted dual-echo MR imaging, and point-resolved 1H MR spectroscopy.* Radiology. 2010, 256, p. 159–68.
18. Yin M., Talwalkar J., Glaser K. et al. *Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography.* Clin Gastroenterol Hepatol. 2007, 5, p. 1202–1213. [PubMed: 17916548]
19. Yoneda M., Suzuki K., Kato S., Fujita K., Nozaki Y., Hosono K. et al. *Nonalcoholic fatty liver disease: US-based acoustic radiation force impulse elastography.* Radiology. 2010, 256, p. 640–7.