

**lek. Kamil Janowski**

## **NIEINWAZYJNE MARKERY STŁUSZCZENIA, WŁÓKNIENIA I ZAPALENIA WĄTROBY U DZIECI Z AUTOIMMUNIZACYJNYMI CHOROBYMI WĄTROBY**

### **STRESZCZENIE**

#### **Wprowadzenie:**

Przezskórna gruboigłowa biopsja wątroby w chorobach wątroby u dzieci stanowi obecnie złoty standard oceny uszkodzenia wątroby. Ograniczenia tej metody i jej inwazyjny charakter wymuszają nieustające poszukiwania nowych nieinwazyjnych metod diagnostycznych, zarówno obrazowych jak i surowiczych markerów, przydatnych w ocenie stopnia uszkodzenia wątroby.

#### **Cel badania:**

Celem badania była i) analiza przydatności wybranych surowiczych markerów: cytokeratyny 18 (CK18), kwasu hialuronowego (HA), czynnika różnicowania wzrostu-15 (GDF15), lamininy (LN), białka C3 (pro-C3), wskaźników FIB-4 i APRI, oraz ALT i AST w ocenie stłuszczenia, zapalenia i włóknienia wątroby, ii) zbadanie przydatności metod wieloparametrycznego rezonansu magnetycznego (mpMRI) i ilościowej oceny dróg żółciowych metodą rezonansu magnetycznego (MRCP+) w diagnostyce i monitorowaniu postępu choroby oraz iii) ocena metody MRCP+ w różnicowaniu autoimmunizacyjnego zapalenia wątroby (AIH) i autoimmunizacyjnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (ASC), u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby w porównaniu do biopsji wątroby.

#### **Metody:**

Analizy przeprowadzono na podstawie materiału zebranego częściowo w ramach wielośrodkowego prospektywnego obserwacyjnego badania klinicznego pt. 'Assessing Kids for Liver Inflammation and Fibrosis Using Non-invasive MRI (Kids4LIFE)' (ClinicalTrials.gov: NCT03198104, Grant Eureka Eurostars 2 E!10124).

Badanie podzielono na 3 etapy: analiza dotycząca nowych nieinwazyjnych markerów surowiczych i markerów wyliczanych na podstawie podstawowych testów laboratoryjnych (FIB-4 i APRI), analiza dotycząca techniki mpMRI oraz techniki MRCP+.

W badaniu przelizowano grupę chorych z AIH i ASC rekrutowanych spośród pacjentów Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii IPCZD w latach 2016-2020 w wieku 6-18 lat, u których wykonano podstawowe badania laboratoryjne oceniające czynność i zapalenie wątroby oraz biopsję wątroby.

W badanych grupach oceniano dodatkowo CK18, HA, GDF15, LN, pro-C3, FIB-4 i APRI oraz wykonano badania mpMRI z oceną cT1 oraz MRCP+ z ilościową oceną dróg żółciowych.

Uzyskane markery surowicze i obrazowe analizowano w porównaniu do oceny histopatologicznej bioptatów wątroby oraz grupy kontrolnej. U części pacjentów z AIH powtórzone badania biochemiczne, mpMRI i biopsję wątroby po 16.2 miesiącach (9-22 miesięcy) oraz oceniono dynamikę zmian histopatologicznych i parametrów mpMRI w czasie. Określono korelacje uzyskanych parametrów surowiczych i obrazowych ze stopniem nasilenia zmian histopatologicznych. Przeprowadzono analizę ROC z oceną nowych markerów w predykcji zmian histopatologicznych o dużym nasileniu (zapalenie zrazikowe i wrotne 2-3 st., włóknienie 2-4 st. wg Batts-Ludwiga, włóknienie 4-6 st. wg Ishaka). Porównano grupy z AIH i ASC oraz metodą krokowej regresji logistycznej wyselekcjonowano markery przydatne w różnicowaniu pomiędzy AIH i ASC.

### **Wyniki:**

Stężenia GDF15, CK18, pro-C3, HA, LN były istotnie wyższe w grupie dzieci z AIH i ASC w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0.001$ ). Potwierdzono pojedynczą korelację stężenia GDF15 ze stopniem zapalenia G wg Batts i Ludwiga ( $R = 0.29$ ,  $p = 0.019$ ). Nie znaleziono istotnych statystycznie korelacji stężenia CK18, HA, pro-C3 i LN ze stopniem włóknienia i zapalenia wątroby u chorych z AIH i ASC.

ALT korelowało istotnie z włóknieniem wg Ishaka ( $R = 0.38$   $p = 0.001$ ), stopniem G i S wg Batts-Ludwiga (odpowiednio:  $R = 0.59$   $p < 0.0001$ ;  $R = 0.26$   $p = 0.03$ ), zapaleniem zrazikowym ( $R = 0.38$   $p = 0.001$ ) oraz zapaleniem wrotnym ( $R = 0.38$   $p = 0.001$ ). Dla AST potwierdzono analogiczne korelacje (odpowiednio:  $R = 0.42$   $p = 0.0003$ ;  $R = 0.54$   $p < 0.0001$ ;  $R = 0.26$   $p = 0.03$ ;  $R = 0.34$   $p = 0.0005$  i  $R = 0.33$   $p = 0.005$ ).

Dla FIB-4 potwierdzono istotne korelacje z włóknieniem ( $R = 0.39$   $p = 0.0009$ ), stopniem G i S wg Batts i Ludwiga (odpowiednio:  $R = 0.26$   $p = 0.03$ ;  $R = 0.24$   $p = 0.04$ ). Analogiczne korelacje potwierdzono dla APRI (odpowiednio:  $R = 0.48$   $p < 0.0001$ ;  $R = 0.47$   $p < 0.0001$ ;  $R = 0.28$   $p = 0.02$ ).

Stężenia GDF15 i pro-C3 różniły się w zależności od stopnia nasilenia włóknienia. GDF15 był istotnie wyższy w podgrupie z włóknieniem stopnia 2-4 wg Batts-Ludwiga w porównaniu do podgrupy z włóknieniem 0-1 (mediana 774 ng/mL vs. 436;  $p = 0.04$ ). Stężenie pro-C3 różniło się istotnie u pacjentów z niewielkim włóknieniem (0-1 wg Ishaka), pośrednim (2-3) i znacznym (4-6) (mediana; odpowiednio: 33.8 ng/mL vs. 28.4 vs. 28.5;  $p = 0.02$ ). Stężenie LN było wyższe u pacjentów z zapaleniem wrotnym st. 2-3 w porównaniu do chorych z niewielkimi zmianami zapalnymi st. 0-1 (mediana 481 ng/mL vs. 277;  $p = 0.04$ ).

Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie pozostałych parametrów surowiczych w zależności od nasilenia zmian histopatologicznych.

Spośród nowych markerów surowiczych GDF15 cechowało się największym polem pod krzywą w analizie ROC w predykcji włóknienia st. 2-4 wg Batts-Ludwiga (AUC=0.65,  $p = 0.03$ , czułość 0.76, swoistość 0.38), podczas gdy LN była markerem o najwyższym AUC=0.63 w

predykcji zapalenia wrotnego st. 2-3 ( $p=0.03$ , czułość 0.53, swoistość 0.73). W predykcji zapalenia zrazikowego 2-3st. GDF15 i HA miały najwyższą wartość AUC (dla GDF15:  $AUC=0.65$ ,  $p=0.03$ , czułość 0.73, swoistość 0.55; dla HA:  $AUC=0.65$ ,  $p=0.02$ , czułość 0.87, swoistość 0.52).

Dla ALT w nasilonym włóknieniu wg Batts-Ludwiga AUC wynosiło 0.68 ( $p=0.005$ , czułość 0.82, swoistość 0.49), w zapaleniu zrazikowym  $AUC=0.77$  ( $p=0.0001$ , czułość 0.41, swoistość 0.93). AST w predykcji nasilonego włóknienia  $AUC=0.69$  ( $p=0.003$ , czułość 0.82, swoistość 0.49), a w zapaleniu zrazikowym  $AUC=0.8$  ( $p=0.0003$ , czułość 0.37, swoistość 0.92).

Dla APRI, AUC w predykcji nasilonego zapalenia zrazikowego wynosiło 0.78 ( $p=0.0003$ , czułość 0.37, swoistość 0.96), a dla włóknienia  $AUC=0.71$  ( $p=0.001$ , czułość 0.79, swoistość 0.54).

Dla FIB4, AUC w predykcji nasilonego zapalenia zrazikowego wynosiło 0.75 ( $p=0.0007$ , czułość 0.43, swoistość 0.92), a dla włóknienia wynosiło 0.63 ( $p=0.045$ , czułość 0.91, swoistość 0.47).

Z uwagi na bardzo małą częstość występowania stłuszczenia wątroby w grupie badanej, przydatność ALT, AST, APRI, FIB-4 i nowych markerów surowiczych w ocenie stłuszczenia wątroby w AIH i ASC nie mogła zostać wiarygodnie oceniona.

Wartość cT1 była istotnie wyższa u chorych z AIH w porównaniu do grupy kontrolnej ( $876.65\pm 71\text{ms}$  vs.  $714.86\pm 33.02\text{ms}$ ,  $p<0.01$ ). U wyjściowo nieleczonych pacjentów z AIH potwierdzono cechy uszkodzenia wątroby i obecności zmian zapalnych w porównaniu z grupą kontrolną. U większości pacjentów, u których po leczeniu potwierdzono zmniejszenie stopnia nasilenia zapalenia i włóknienia, nastąpił istotny spadek wartości cT1 (od średniej 876 do 745 ms, ( $p=0.0002$ ) w ocenie kontrolnej po 16.2 miesiącach (9-22 miesięcy). U sześciu pacjentów stwierdzono obecność włóknienia w biopsji wątroby oraz podwyższony cT1 w mpMRI (wskazujący na obecność włóknienia i zapalenia) pomimo remisji biochemicznej (normalizacji ALT, AST i IgG).

cT1 korelował istotnie z włóknieniem wg Batts-Ludwiga ( $r=0.38$ ,  $p=0.001$ ), zapaleniem zrazikowym ( $r=0.32$ ,  $p=0.016$ ) i wrotnym ( $r=0.35$ ,  $p=0.008$ ).

AUC dla cT1 w predykcji włóknienia  $\geq 2$ st. wg Batts-Ludwiga wynosiło 0.59 (czułość 0.28, swoistość 1,  $p=0.162$ ), w zapaleniu wrotnym  $\geq 2$ st.  $AUC=0.63$  (czułość 0.33, swoistość 0.96,  $p=0.04$ ), w zapaleniu zrazikowym  $\geq 2$ st.  $AUC=0.71$  (czułość i swoistość 0.67,  $p=0.03$ ) u chorych z AIH i ASC.

19 parametrów uzyskanych z MRCP+ korelowało z parametrami biochemicznymi ( $0.29\leq r\leq 0.43$ ,  $p<0.05$ ). GGTP i parametry MRCP+ były istotnie wyższe w grupie dzieci z ASC w porównaniu do grupy dzieci z AIH. Najlepszy wieloczynnikowy model rozróżniający chorych z

ASC i AIH utworzyło połączenie parametrów: całkowita liczba przewodów oraz suma względnego nasilenia zwężeń i poszerzeń dróg żółciowych, z wysoką wartością AUC: 0.91 (95% CI 0.78–1).

### **Wnioski:**

Przeprowadzona analiza wykazała ograniczoną przydatność GDF15, LN i HA w ocenie uszkodzenia wątroby u dzieci z AIH i ASC. Aktywność ALT i AST oraz parametry APRI i FIB-4 umiarkowanie odzwierciedlają zmiany histopatologiczne wątroby (nasilone włóknienie i zapalenie zrazikowe) u dzieci z AIH i ASC. CK18 i pro-C3 nie są przydatne w ocenie zapalenia i włóknienia wątroby u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby. Mimo potwierdzonych zależności poszczególnych serologicznych markerów ze stopniem nasilenia zmian histologicznych, ich przydatność mierzona czułością i swoistością wydaje się być ograniczona w praktyce klinicznej.

Po raz pierwszy oceniono metodę mpMRI u dzieci i wykazano możliwość wykorzystania tej techniki w nieinwazyjnej ocenie podstawowej aktywności autoimmunizacyjnej choroby wątroby u dzieci. Wyniki wskazały na związek między cT1 a wybranymi cechami histologicznymi choroby (zapalenie wrotne i zrazikowe). Wykazano, że cT1 można wykorzystać jako dodatkowy biomarker do oceny aktywności choroby i uszkodzenia wątroby przydatny w monitorowaniu leczenia. Badanie zidentyfikowało mpMRI jako potencjalne narzędzie do nieinwazyjnego monitorowania AIH i uzasadnia przyszłe prospektywne badania kliniczne w celu pełnego zbadania użyteczności tej metody w praktyce klinicznej.

Udowodniono, że, metoda ilościowego obrazowania dróg żółciowych MRCP+ dostarcza licznych danych ilościowych, które można wykorzystać do oceny drzewa żółciowego oraz które mogą skutecznie wykazać różnice między pacjentami z ASC a pacjentami z AIH. Łącząc dane ilościowe MRCP+ osiągnięto korzystny model różnicujący chorych z ASC i AIH. Dalsze rozwijanie metody MRCP+ może stanowić istotne wsparcie technik radiologicznych w diagnostyce i monitorowaniu autoimmunizacyjnych chorób wątroby u dzieci.