

# Korisnost neinvazivne tranzijetne elastografije i biokemijskih markera u procjeni steatoze, fibroze i upale kod pacijenata s nealkoholnom masnom bolesti jetre

---

Lukić, Anđela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:803788>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Andela Lukić

KORISNOST NEINVAZIVNE TRANSIJENTNE ELASTOGRAFIJE I BIOKEMIJSKIH  
MARKERA U PROCJENI STEATOZE, FIBROZE I UPALE KOD PACIJENATA S  
NEALKOHOLNOM MASNOM BOLESTI JETRE

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Andela Lukić

KORISNOST NEINVAZIVNE TRANSIJENTNE ELASTOGRAFIJE I BIOKEMIJSKIH  
MARKERA U PROCJENI STEATOZE, FIBROZE I UPALE KOD PACIJENATA S  
NEALKOHOLNOM MASNOM BOLESTI JETRE

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: doc.dr.sc. Ivana Mikolašević, dr.med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Sandra Milić, dr.med. (predsjednik Povjerenstva)

2. doc.dr.sc. Vanja Licul, dr.med.

3. prof.dr.sc. Dražen Kovač, dr.med.

Rad sadrži 43 stranice, 5 slika, 8 tablica, 27 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Posebna zahvala mentorici, doc. dr. sc. Ivana Mikolašević, dr. med., na strpljenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Veliko hvala za svaku pruženu priliku i ukazano povjerenje.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i sestrama na razumijevanju, ljubavi i podršci tijekom cijelog studija. Ova diploma je i vaša.

Hvala i mojim prijateljima, bez vas bi ovo bilo puno manje zabavno.

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	MATERIJALI I METODE.....	4
2.1.	Ispitanici i izgled studije .....	4
2.2.	Ishodi .....	4
2.3.	Kriteriji za sudjelovanje .....	5
2.4.	Karakteristike pacijenata .....	6
2.5.	Receptori stanične smrti M30 i M60.....	7
2.6.	M30 – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	7
2.7.	M65 - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	8
2.8.	Biopsija jetre i histološka analiza.....	8
2.9.	Mjerenja transijentnom elastografijom .....	9
2.10.	Statistička analiza.....	10
3.	REZULTATI.....	12
3.1.	Evaluacija steatoze CAP-om.....	15
3.2.	Evaluacija fibroze LSM-om.....	17
3.3.	Utjecaj sonde, vrijednosti ALT-a, AST-a, CAP-a i steatoze na LSM .....	19
3.4.	Procjena fibroze na temelju biokemijskih markera.....	21
3.5.	Evaluacija NASH-a temeljena na biokemijskim markerima i elastografiji .....	26

4.	RASPRAVA .....	29
5.	ZAKLJUČAK .....	34
6.	SAŽETAK .....	35
7.	SUMMARY .....	37
8.	LITERATURA .....	38
9.	ŽIVOTOPIS .....	43

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

ALP – alkalna fosfataza

ALT – alanin-aminotransferaza

AST – aspartat-aminotransferaza

AUROC – površina ispod krivulje (eng. *area under the curve*)

BMI – indeks tjelesne mase (eng. *body mass index*)

CAP – parametar steatoze (eng. *controlled attenuation parameter*)

GGT – gama-glutamil transferaza

HCC – hepatocelularni karcinom

HDL – lipoprotein visoke gustoće

IQR – interkvartilni raspon (eng. *interquartile range*)

LDL – lipoprotein niske gustoće

LSM – parametar fibroze (eng. *liver stiffness measurement*)

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*)

NASH – nealkoholni steatohepatitis (eng. *non-alcoholic steatohepatitis*)

T2DM – dijabetes melitus tip 2

TE – tranzijentna elastografija



## 1. UVOD

Nealkoholna masna bolest jetre (eng. *Nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) povezana je sa metaboličkim sindromom i njegovim komponentama: pretilosti, hipertenzijom, dijabetes melitusom tip 2 (T2DM) i dislipidemijom. NAFLD je klinički sindrom koji se sastoji od više stanja, steatoze - nealkoholna masna jetra (eng. *nonalcoholic fatty liver*, NAFL), nekroinflamatorna forma nealkoholnog steatohepatitisa (eng. *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), fibroze i ciroze jetre te hepatocelularnog karcinoma (HCC). Zadnjih nekoliko godina istraživanja pokazuju razvoj hepatocelularnog karcinoma i kod pacijenata koji nemaju razvijenu cirozu jetre. Danas je NAFLD jedna od najčešćih kroničnih bolesti zapadnog svijeta i rastući etiološki faktor za cirozu jetre i HCC. Stoga, zbog povećanja incidencije T2DM, pretilosti i metaboličkog sindroma, ciroza jetre i HCC uzrokovanih NASH-om u budućnosti će postati glavne indikacije za transplantaciju jetre (1-3). Brojna istraživanja dokazuju kako NAFLD nije samo bolest jetre, već je povezana sa nekoliko različitih ekstrahepatalnih kroničnih bolesti. Danas sa sigurnošću znamo da je NAFLD multisistemna bolest povezana sa kardiovaskularnim bolestima, kroničnom bolesti bubrega, dijabetesom tip 2, ali i drugim bolestima bitnim za javno zdravlje kao što su polipoza kolona i kolorektalni karcinom (4). Nedavna ispitivanja pokazuju da je prisutnost fibroze bitan prediktor razvoja kliničke slike, ali i morbiditeta i mortaliteta kod NAFLD-a. Stoga je detekcija fibroze kod pacijenata s NAFLD-om važna radi predviđanja razvoja bolesti jetre, ali predstavlja i faktor rizika za ekstrahepatične komplikacije NAFLD-a (5-8). S obzirom da trećina svjetske populacije ima NAFLD, nemoguće je svima napraviti biopsiju, zato nam trebaju neinvazivne metode da bismo utvrdili težinu bolesti jetre kod svakog pacijenta.

Biopsija jetre je zlatni standard u detekciji i ocjenjivanju histoloških stadija NAFLD-a. Međutim, biopsija jetre je invazivna metoda sa brojnim komplikacijama i podliježe greškama operatera.

Potruga za neinvazivnim metodama se intenzivirala u posljednjih nekoliko godina, s naglaskom na biokemijske i elastografske metode dijagnosticiranja i ocjenjivanja histoloških stadija NAFLD-a. Idealno, potrebni su nam biomarkeri koji mogu detektirati i ocijeniti steatozu, upalu i fibrozu. Zasad su istraživanja biokemijskih markera za fibrozu fokusirana na FIB-4 i APRI bodovne sustave, a u zadnje vrijeme i na receptore stanične smrti M30 i M65, ne samo za fibrozu, već i za upalne promjene (NASH). Transijentna elastografija (TE), poznatija kao FibroScan<sup>®</sup> (Echosense, Paris, France), je trenutno jedna od istraživanih elastografskih metoda. Transijentna elastografija je neinvazivna metoda koja funkcionira na principu kao i ultrazvuk, brzina prodiranja ultrazvučnog vala kroz jetreni parenhim korelira sa tvrdoćom jetre i točno procjenjuje stupanj fibroze - LSM (*liver stiffness measurement*) (8-12). 2011. u FibroScan<sup>®</sup> je implementiran i CAP (*controlled attenuation parameter*) koji detektira i kvantificira steatozu jetre. Danas svaki FibroScan<sup>®</sup> uređaj mjeri i LSM i CAP što omogućava simultanu detekciju steatoze i fibroze jetre (13).

Uspoređujući TE sa biopsijom jetre, FibroScan<sup>®</sup> analizira sto puta veći površinu jetrenog parenhima (9,13). Ranija ispitivanja pokazala su kako M sonda FibroScan<sup>®</sup>-a nije adekvatna kod pacijenata koji imaju indeks tjelesne mase (BMI)  $>30\text{kg/m}^2$  (14). Posljedično, dizajnirana je XL sonda za adekvatnu evaluaciju pretilih pacijenata (8). Još uvijek nisu službeno definirane granične vrijednosti stadija steatoze i fibroze kod bolesnika sa NAFLD-om te samim time utjecaj histoloških stadija na rezultate TE ostaje nejasan (8). Također, dvojbeno je variraju li granične vrijednosti steatoze i fibroze ovisno koju probu koristimo (M ili XL) (8).

Stoga, cilj našeg istraživanja je ocijeniti LSM i CAP kao elastografske dijagnostičke metode za identifikaciju steatoze i fibroze jetre u usporedbi sa biopsijom jetre kao zlatnim standardom. Fokus nam je bio i istražiti biokemijske markere (FIB-4 i APRI bodovne sustave, receptore

stanične smrti M30 i M65) kao dijagnostičke markere za stupnjevanje fibroze. Također, željeli smo istražiti utjecaj tipa sonde, vrijednosti transaminaza i stupanj steatoze (dobivene CAP-om i biopsijom) na vrijednosti LSM-a.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. *Ispitanici i izgled studije*

Ovo istraživanje je retrospektivna studija, s primarnim i sekundarnim rezultatima za procjenu dijagnostičkog značaja elastografskih parametara steatoze (CAP) i fibroze (LSM), biokemijskih markera (M30, M65, APRI, FIB-4) i njihove kombinacije u usporedbi sa biopsijom jetre, koja je zlatni standard u detekciji jetrene steatoze i fibroze, kao i NASH-a.

Na NAFLD smo posumnjali kod pacijenata koji imaju jednu ili više komponenti metaboličkog sindroma (T2DM, hipertenziju, pretilost i/ili dislipidemiju), alterirane jetrene enzime i promjene na ultrazvuku abdomena u smislu „svijetle“ jetre. U studiju su uključeni pacijenti sa Zavoda za gastroenterologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka u periodu od 15.10.2017. do 15.05.2019. Svi pacijenti su potpisali informirani pristanak.

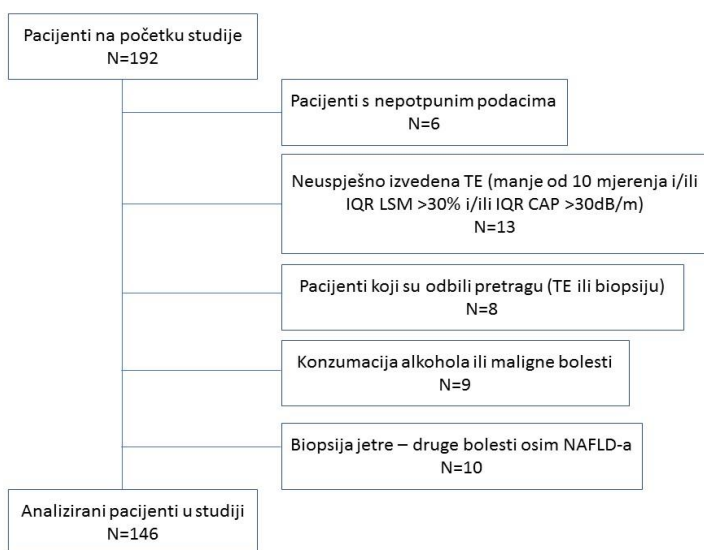
### 2.2. *Ishodi*

Primarni cilj ovog istraživanja je istražiti dijagnostičku preciznost CAP-a i LSM-a izmjerenih XL ili M sondom (ovisno o preporuci FibroScana<sup>®</sup>) i usporediti ih sa histološkom ocjenom steatoze i fibroze jetre. Sekundarni cilj je procijeniti dijagnostičku točnost receptora stanične smrti (M30 i M65), FIB-4 i APRI bodovnih sustava u detekciji i stupnjevanju fibroze. Također, istražili smo dijagnostičke mogućnosti kod kombinacije LSM-a, M30 i M65 u detekciji fibroze u različitim stadijima. Na kraju, istražili smo dijagnostičku preciznost receptora stanične smrti (M30 i M65), CAP-a i LSM-a u otkrivanju nekroinflamatorne forme NAFLD-a (NASH).

### 2.3. Kriteriji za sudjelovanje

U istraživanju su sudjelovali pacijenti stariji od 18 godina, koji su potpisali informirani pristanak te su također imali nalaze FibroScana<sup>®</sup> i biopsije jetre u razmaku od 15 dana.

Kriteriji za isključivanje su bili povijest konzumacije alkohola (više od 20g dnevno), serološki potvrđena hepatitis B ili C infekcija, uporaba hepatotoksičnih lijekova u zadnjih 6 mjeseci, pozitivna anamneza na autoimune, metaboličke ili kolestatske jetrene bolesti, kliničke ili laboratorijske indikacije za metaboličku ili sintetičku disfunkciju jetre, poznata maligna bolest. Isključili smo pacijente s ascitesom, zatajenjem srca i pacijente s pacemakerom. Nadalje, u studiji nisu sudjelovali bolesnici koji su imali manje od 10 uspješnih FibroScan<sup>®</sup> mjerenja, kao i one koji su imali interkvartilni raspon (IQR) CAP-a jednak ili više od 30 dB/m ili srednji IQR >30%. Pacijenti sa nepotpunim podacima i bolesnici kojima nije potvrđen NAFLD histološki (4 pacijenta sa toksičnim hepatitisom, 2 sa primarnim bilijarnim kolangitisom, jedan sa granulomatoznom bolesti jetre, jedan s autoimunim hepatitisom i 2 sa intrahepatalnom kolestazom) su također isključeni. Slika 1 prikazuje dijagram tijekom studije.



Slika 1. Tijek studije

#### 2.4. Karakteristike pacijenata

Podatke koje smo analizirali kod svakog pacijenta su dob, spol, BMI, opseg nadlaktice, opseg struka i bokova, pozitivna anamneza na T2DM, hipertenziju ili dislipidemiju.

Svim pacijentima smo radili laboratorijske nalaze krvi uključujući kompletnu krvnu sliku, bubrežne parametre (urea, kreatinin), serumsku glukozu, hepatogram [aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama-glutamil transferaza (GGT), alkalna fosfataza (ALP)], lipidogram (ukupni kolesterol, LDL i HDL kolesterol, trigliceridi), urate, feritin i C-reaktivni protein (CRP). Analizirali smo i sintetičku funkciju jetre preko protrombinskog vremena, serumskog albumina i vrijednosti bilirubina.

Gore spomenuti laboratorij se rutinski vadi svim pacijentima s kroničnom bolesti jetre na Zavodu za gastroenterologiju KBC Rijeka. Osim rutinskog laboratorija, svaki pacijent je testiran na virusne (hepatitis B i C) i druge jetrene bolesti (primarni bilijarni kolangitis, primarni sklerozirajući kolangitis, autoimuni hepatitis i sindrom preklapanja). Rutinski bolesnike testiramo i na metaboličke bolesti jetre, Wilsonovu bolest i hemokromatozu. Inzulinsku rezistenciju računali smo po HOMA-IR modelu (*homeostasis model assessment-estimated insulin resistance*):  $HOMA-IR = [glukoza \text{ (nmol/l)} \times inzulini \text{ (}\mu\text{U/ml)}] / 22.5$ .

FIB-4 bodovni sustav (eng. *score*) računali smo po formuli:  $FIB-4 = [dob \text{ (godine)} \times AST \text{ (IJ/l)}] / [broj \text{ trombocita } (10^9/l) \times \sqrt{ALT \text{ (IJ/l)}}]$  (15, 16).

Za izračun APRI bodovnog sustava koristili smo formulu:  $APRI = [ (AST/gornja \text{ granica normalne vrijednosti AST-a)} / broj \text{ trombocita } (10^9/l) ] \times 10$  (15, 16)

### 2.5. *Receptori stanične smrti M30 i M60*

Receptore stanične smrti (M30 i M65) analizirali smo u 120 pacijenata. Uzorci krvi za oba biomarkera prikupljeni su od sudionika u običnim epruvetama (BD Vacutainer® tube, Plymouth, U.K.) te su odmah prevezene u Klinički odjel za laboratorijsku dijagnostiku KBC Rijeka. Nakon isporuke, iz uzoraka su odvojene stanice od seruma i centrifugirane pomoću stolne centrifuge. Prikupljeni uzorci su razdvojeni u dva alikvota i čuvani na -80°C. Svaki alikvot i za M30 i M65 se otapao na sobnoj temperaturi prije analize.

### 2.6. *M30 – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Serumska koncentracija M30 izmjerena je komercijalnim ELISA testom, M30 Apoptosense ELISA Kit (Peviva, VLVBIO, Sweden) po uputama proizvođača, ELISA procesorom ThunderBolt (Gold Standard Diagnostics, Davis, CA, USA) u Kliničkom odjelu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Rijeka.

Ukratko, korištena su mišja monoklonalna protutijela M5 i premazane trake s 96 jažica. U svaku jažicu dodani su M30 standardi (0, 75, 150, 250, 500, 750 i 1000 U/L), Control High, Control Low i uzorci (25 µL), te zatim i razrijeđena otopina M30 konjugata (75 µL). Ploča se inkubirala na sobnoj temperaturi 4 sata dok se centrifugirala na 600 rpm. Nakon ispiranja ploče s otopinom tableta za ispiranje (400 µl po jažici), 200 µl TMB substrata je dodano u svaku jažicu i inkubirano 20 min u mraku. Reakcija je zaustavljena dodavanjem Stop otopine (50 µl) i apsorbancija je izmjerena na 450 nm u roku od 30 min.

ThunderBolt softver izračunao je rezultate M30 prema kalibracijskoj krivulji konstruiranoj iz apsorpcijskih standarda M30 i njihovih koncentracija. Raspon mjerenja M30 je bio 0 – 1000 U/l.

### 2.7. M65 - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Serumske koncentracije M65 izmjerene su komercijalnim ELISA testom, M65 EpiDeath ELISA Kit (Peviva, VLVBIO, Sweden), prema uputama proizvođača, ELISA procesorom ThunderBolt (Gold Standard Diagnostics, Davis, CA, USA) u Kliničkom centru za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Rijeka.

Ukratko, korištene su trake s 96 jažica obloženih M5 monoklonalnim protutijelima. U svaku jažicu dodani su M65 standardi (0, 200, 400, 800, 1200, 2000, 3000 i 5000 U/L), Control High, Control Low i uzorci (25 µl), te zatim i razrijeđena otopina M65 EpiDeath konjugata (75µl). Ploča se inkubirala na sobnoj temperaturi 4 sata dok se centrifugirala na 600 rpm. Nakon ispiranja ploče s otopinom tableta za ispiranje (400 µl po jažici), 200 µl TMB substrata je dodano u svaku jažicu i inkubirano 20 min u mraku. Reakcija je zaustavljena dodavanjem Stop otopine (50 µl) i apsorbancija je izmjerena na 450 nm u roku od 30 min.

ThunderBolt softver izračunao je rezultate M65 prema kalibracijskoj krivulji konstruiranoj iz apsorpcijskih standarda M65 i njihovih koncentracija. Raspon mjerenja M65 je 0 – 5000 U/l.

Receptore stanične smrti M30 i M65 mjerili smo kod 120 pacijenata.

### 2.8. Biopsija jetre i histološka analiza

Biopsija jetre izvedena je pod kontrolom ultrazvuka i prema standardiziranim protokolima. Standardizirani protokol podrazumijeva formalinsku fiksaciju uzorka biopsije, ugradnju parafina, hematoksolina te obojenje eozinom i Malloryjem za procjenu fibroze. Histološke uzorke analizirali su iskusni patolozi koji nisu znali podatke o pacijentima koji sudjeluju u istraživanju. Ocjenjivali su steatozu (0-3), baloniranje hepatocita (0-2), lobularnu upalu (0-3) i fibrozu (0-4)



prema NASH CRN bodovnom sustavu i NAFLD activity bodovnom sustavu (NAS) (17). Iz istraživanja smo isključili pacijente koji nisu imali steatozu u histološkim uzorcima biopsije jetre. Patolozi su zaključili nalaze kao NAFLD (ne-NASH steatoza), NASH ili kao druge bolesti jetre kod kojih nisu ispunjeni kriteriji za NASH (toksični hepatitis, intrahepatična kolestaza, autoimuni hepatitis, granulomatozna bolest jetre, primarni bilijarni kolangitis). Samo su dva pacijenta razvili komplikacije biopsije, osjećali su intenzivnu bol koja je zahtijevala opservaciju i analgeziju.

### *2.9. Mjerenja transijentnom elastografijom*

Jedan operater je napravio mjerenja transijentnom elastografijom na svim pacijentima kako bi se smanjila varijabilnost među rezultatima. Koristili smo Fibroscan® 502 Touch operating software (Echosens, Paris, France), kojim je upravljao adekvatno obučen liječnik. Za poboljšanu točnost koristili smo Medium (M+) i Extra Large (XL+) Fibroscan® sondu. Nadalje koristili smo Fibroscan® 502 Touch koji ima operativni softver sa automatskim odabiranjem sonde. Mjerna jedinica za elastografski parametar steatoze (CAP) je decibel po metru (dB/m), a za jetrenu fibrozu je kilopaskal (kPa). Odnos interkvartilog raspona (IQR) i medijana LSM-a (IQR/MLSM) izračunat je kao pokazatelj varijabilnosti. To znači da smo prilikom analize u obzir uzimali samo ona mjerenja gdje je IQR/MLSM odnos LSM-a bio  $<0,3$ , s uspješnošću najmanje 60% i najmanje 10 validnih uzastopnih mjerenja.

Svi pacijenti su bili natašte najmanje 3 sata prije Fibroscan® pretrage. Za vrijeme pretrage pacijent leži na leđima, s desnom rukom iznad glave i desnom nogom preko lijeve. Na taj način

se dodatno proširuje interkostalni prostor i omogućava točnija mjerenja steatoze i fibroze. Niti jedan pacijent nije imao nuspojave nakon pretrage.

### 2.10. Statistička analiza

U primarnoj evaluaciji rezultata koristili smo deskriptivnu statistiku za utvrđivanje standardne devijacije, standardnih pogrešaka, raspona i drugih statističkih parametara. Izračun koeficijenta korelacije (Spearman's) omogućuje pronalazak korelacije između varijabli.

Kontinuirani podaci prikazani su kao prosjek i standardna devijacija. Podaci koji se odnose na kategoričke varijable (poput onih „koji imaju  $F \geq F1$ “) prikazani su u postocima. U uzorcima za usporedbu, bez obzira jesu li zavisni ili nezavisni, koristili smo Studentov t-test. U slučaju više nezavisnih uzoraka (kod različitih veličina uzoraka kao što su CAP vs stadij steatoze i LSM vs stadij fibroze) koristili smo Kruskal–Wallis H jednosmjernu analizu varijance (*one-way ANOVA*). U tim slučajevima varijacije između skupova podataka testirane su post-hoc analizom Dunnovim post-hoc testom. U izračunu odstupanja između više zavisnih uzoraka korišten je Friedmanov ANOVA test. Friedmanov ANOVA test je oblik neparametrijske jednosmjerne analize varijance (*one-way ANOVA*). Rezultati Friedmanov ANOVA testa normalizirani su Kendall W testom (Kendallov koeficijent slaganja).

Za neke varijable izvršili smo više korelacija, kombinirajući „veličinu sonde“, „AST“, „ALT“, „medijan CAP-a“ sa stupnjem steatoze. Ove varijable testirali smo multivarijantnim testovima (Shapiro-Wilk test).

Cilj nam je bio utvrditi utjecaj različitih parametara na pozitivnu prediktivnu vrijednost (eng. *positive predictive value* - PPV) i negativnu prediktivnu vrijednost (eng. *negative predictive*

value - NPV) LSM i CAP rezultata koristeći različite pre-test vrijednosti. U vezi s tim konstruirali smo krivulju radne karakteristike prijemnika (eng. *receiver operating characteristic* - ROC) za predstavljanje vrijednosti senzitivnosti i (1-specifičnosti) dobivenih u rasponu pragova\_(srednje vrijednosti za valjane uzorke) s našom konačnom graničnom vrijednosti koja predstavlja uzorak s postavljenom osjetljivošću praga  $\geq 80\%$  (iz matrice konfuzije). Normalizirali smo podatke tako da su osi x i y u jedinstvu; nakon primjene granične vrijednosti na naše podatke i procjene stvarne pozitivne stope (true positive rate – TPR ili senzitivnost) i lažno pozitivne stope (false positive rate - FPR) [po formulama:  $TPR = \frac{\text{točno pozitivni}}{\text{točno pozitivni} + \text{lažno negativni}}$ ; i  $FPR = \frac{\text{lažno pozitivni}}{\text{lažno pozitivni} + \text{točno negativni}}$ ] konačno smo izračunali i površinu ispod ROC krivulje (AUC tj. AUROC). Što je veći AUROC veća je i točnost izračuna.

P-vrijednost od 0.05 i niže smatra se statistički značajnom razlikom. Svi izračuni izvršeni su u programu StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (softverski sustav za analizu podataka), verzija 12. Isti softver korišten je za crtanje dijagrama korelacije raspršenja. Boxplotovi su napravljeni u Excelu.

### 3. REZULTATI

Tablica 1 sadrži sve demografske, antropometričke, laboratorijske i histološke karakteristike, kao i rezultate FibroScan® pretrage svih analiziranih pacijenata. U 87 (59.6%) od 146 pacijenata s validnim FibroScan® rezultatima, pretraga je napravljena M sondom. Pacijenti pregledani XL sondom imali su značajno veći BMI od pacijenata pregledani M sondom ( $34.9 \pm 4.9$  vs.  $30.3 \pm 4.6$ ;  $p < 0.05$ ).

Tablica 1. Karakteristike analiziranih pacijenata

<b>Varijable</b>	<b>Distribucija</b>	<b>N</b>	<b>Opseg</b>
Životna dob (godine)	$57.81 \pm 11.5$	146	57
Spol (muškarac)	75 (51.4%)	146	
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$33.11 \pm 5,32$	146	24.88
Šećerna bolest, n (%)	66 (45.2%)	146	
Hipertenzija, n(%)	109 (74.7%)	146	
Dislipidemija, n(%)	108 (74%)	146	
Broj trombocita ( $10^9/\text{L}$ )	$220.83 \pm 54.1$	146	271
AST (IU/ml)	$35.61 \pm 23.53$	146	173
ALT (IU/ml)	$49.04 \pm 34.99$	146	280
GGT (IU/ml)	$69.39 \pm 71.38$	146	619

ALP (IU/L)	74.58±23.65	146	166
Albumin (g/dL)	45.62±9.16	146	99.3
Glukoza natašte (mmol/L)	8.07±11.45	146	134.2
HOMA-IR bodovni sustav	10.79±67.79	146	822.04
Opseg struka (cm)	110.97±13.37	146	66
Opseg kukova (cm)	111.37±15.06	146	108
Opseg ruke (cm)	34.38±7.01	146	56
Ukupni kolesterol (mmol/L)	6.2±11.76	146	133.3
LDL-kolesterol (mmol/L)	4.1±12.84	146	135.4
HDL-kolesterol (mmol/L)	2.5±12.97	146	135.2
Trigliceridi (mmol/L)	3.03±11.97	146	135.5
Feritin (mmol/L)	229.66±219.84	146	1499.2
Urati (mmol/L)	355.65±84.1	146	414
M30	199.79±289.88	135	1926
M65	359.02±418.59	134	1801
FIB-4 bodovni sustav	1.45±0.85	146	

APRI bodovni sustav	0.58±0.47	146	3.33
M sonda, n(%)	87 (59.6%)	146	
CAP (dB/m)	323.11±49.84	146	300
LSM (kPa)	8.21±4.89	146	39.2
Stupanj fibroze, n(%)	F0	16 (11%)	146
	F1	61 (41.8%)	
	F2	50 (34.2%)	
	F3	16 (11%)	
	F4	3 (2.1%)	
Stupanj steatoze, n(%)	S1	74 (50.7%)	146
	S2	53 (36.3%)	
	S3	19 (13%)	
NAS bodovni sustav, n(%)	<5	87 (59.6%)	146

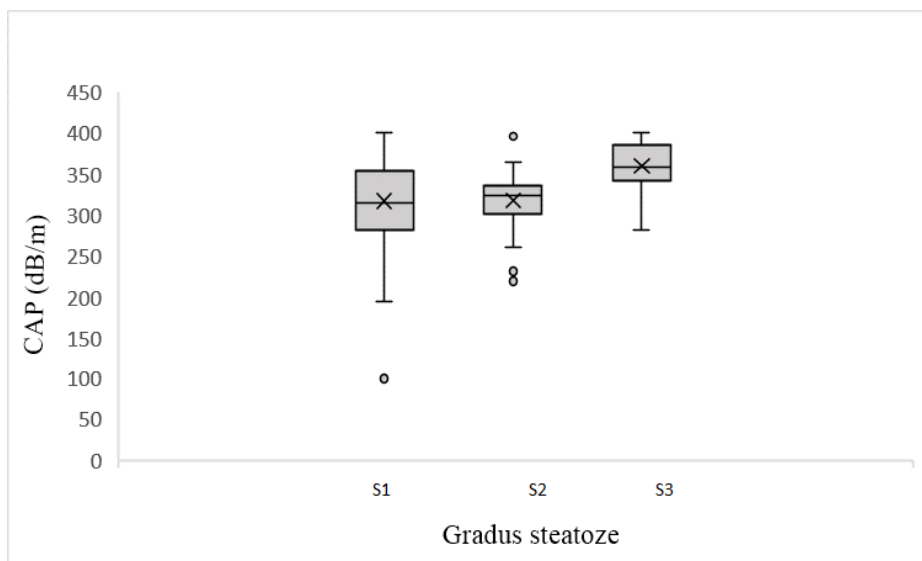
\* Distribucija je izražena kao srednja vrijednost i standardno odstupanje ili kao brojka i postotak.

\*\* BMI – indeks tjelesne mase (eng. *body mass indeks*); AST – aspartat aminotransferaza; GGT – gamaglutamil transferaza; ALP – alkalna fosfataza, HDL – lipoprotein velike gustoće (eng. *high-density lipoprotein*); LDL – lipoprotein niske gustoće (eng. *low-density lipoprotein*), CAP –

parametar statoze (eng. *controlled attenuation parameter*), LSM – parametar fibroze (eng. *liver stiffness measurement*)

### 3.1. Evaluacija steatoze CAP-om

Kod 146 pacijenata sa validnim Fibroscan® mjerenjima i biopsijom jetre, distribucija steatoze je S1=74 (50.7%), S2= 53 (36.3%) i S3= 19 (13%). Kao što je i prikazano na slici 2, vrijednosti CAP-a se povisuju sa stupnjem steatoze. Vrijednosti CAP-a su signifikantno drukčije između S1 i S3, kao i između S2 i S3.



Slika 2: Boxplot odnosa CAP-a i gradusa steatoze. CAP vrijednosti rastu porastom gradusa steatoze. (Kruskal-Wallis test 0.001016, Dunn's post hoc testovi: P 1/3 = 0.001071016 između CAP u S1 i CAP u S3; 0.000726017 između CAP u S2 i CAP i S3)

AUROC i dijagnostička učinkovitost CAP graničnih vrijednosti su prikazani u tablici 2. Granična vrijednost CAP-a od 296 dB/m za predviđanje S1 stupnja steatoze ima izrazito velik dijagnostički značaj od 0.92 (95% CI 0.83-1.01), ima senzitivnost od 84.5% i specifičnost 94.2%,

PPV 94.2% i NPV 59.1%. Preciznost pada za druga dva gradusa steatoze; za  $S \geq S2$  AUROC je 0.80, senzitivnost 93.9%, specifičnost 85%, PPV 91.2% i NPV 89.5% za graničnu vrijednost od 327 dB/m. AUROC je 0.86 za  $S \geq S3$ , senzitivnost 92.9%, specifičnost 80%, PPV 9.9%, NPV 80% za graničnu vrijednost 368 dB/m.

Tablica 2. Dijagnostička pouzdanost CAP-a za evaluaciju gradusa steatoze većoj ili jednakoj 1, 2 ili 3

	$S \geq S1$	$S \geq S2$	$S \geq S3$
<b>Granična vrijednost (dB/m)</b>	<b>296</b>	<b>327</b>	<b>368</b>
	Se $\geq 0.8$ ; Sp $\geq 0.8$	Se $\geq 0.8$ ; Sp $\geq 0.8$	Se $\geq 0.8$ ; Sp $\geq 0.8$
<b>AUROC (95%CI)</b>	0.92 (0.83-1.01)	0.80 (0.73-0.88)	0.86 (0.81-0.92)
<b>Senzitivnost</b>	84.48% (72.58% - 92.65%)	93.94% (79.77% - 99.26%)	92.86% (66.13% - 99.82%)
<b>Specifičnost</b>	81.25% (54.35% - 95.95%)	85.0% (62.11% - 96.79%)	80.0% (28.36% - 99.49%)
<b>PPV</b>	94.23% (84.05% - 98.79%)	91.18% (76.32% - 98.14%)	92.86% (66.13% - 99.82%)
<b>NPV</b>	59.09%	89.47%	80.0%

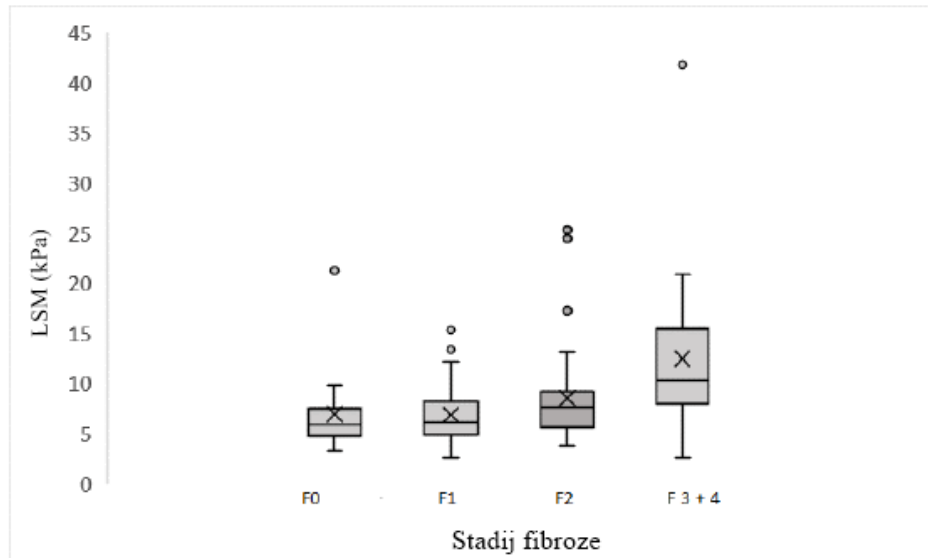


	(36.35% - 79.29%)	(66.86% - 98.7%)	(28.36% - 99.49%)
--	-------------------	------------------	-------------------

\*AUROC – površina ispod dijagrama (*area under the curve*); PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV – negativna prediktivna vrijednost

### 3.2. Evaluacija fibroze LSM-om

Distribucija fibroze kod pacijenata u ovom istraživanju je F0: 16 (11%), F1: 61 (41.8%), F2: 50 (34.2%), F3: 16 (11%), F4: 3 (2.1%). Stupanj F3 i F4 smo analizirali skupa s obzirom da su samo 3 pacijenta imali F4 stupanj fibroze. Korelacija LSM-a i fibroze prikazana je u boxplotu na slici 3 i upućuje na značajan porast LSM-a sa rastućim stupnjem fibroze. LSM se signifikantno razlikovao između F0 i F3/F4 stadija.



Slika 3. Boxplot korelacije LSM-a i stadija fibroze. Vrijednosti LSM-a značajno rastu porastom stadija fibroze (Kruskal-Wallis  $P= 0.000589$ ; Dunn's post hoc tests,  $P_{1/4}= 0.012184688$  između LSM u stadiju fibroze 0 i LSM u stadiju fibroze 3 i 4).

Nadalje, analizirajući sposobnost LSM-a za dijagnosticiranje različitih stadija fibroze, pronašli smo da najveću točnost ima na pragu  $F \geq F_2$ , sa AUROC 0.91 (95% CI 0.77–1.05), senzitivnosti 93.1%, specifičnosti 88.9%, PPV 98.2% i NPV 66.7% za granicu od 9.5 kPa. Točnost je nešto niža kod nižih vrijednosti fibroze, AUROC 0.90 (0.88–0.92) za  $F \geq F_1$  sa senzitivnosti 96.1%, specifičnosti 88.9%, PPV 96.1% i NPV 88.9% za graničnu vrijednost od 8.5 kPa. Za dijagnosticiranje  $F \geq F_3$  AUROC je 0.87 (0.74–0.89), sa senzitivnosti 82.21%, specifičnosti 98%, PPV 84.1% i NPV 51.87% za graničnu vrijednost 13.6 kPa, kao što je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Dijagnostička pouzdanost LSM-a za stadij fibroze veći ili jednak 1, 2 ili 3.

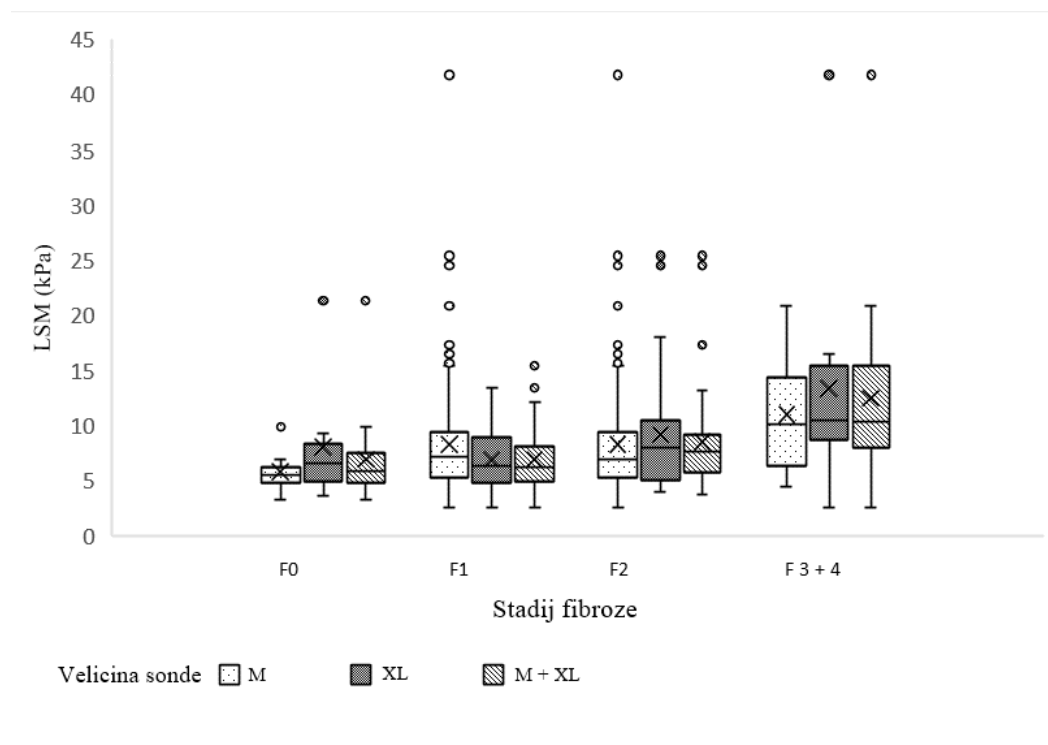
	<b><math>F \geq F_1</math></b>	<b><math>F \geq F_2</math></b>	<b><math>F \geq F_3</math></b>
<b>Granične vrijednosti (kPa)</b>	<b>8.5</b>	<b>9.5</b>	<b>13.6</b>
	Se $\geq$ 0.85	Se $\geq$ 0.85	Se $\geq$ 0.80
<b>AUROC (95%CI)</b>	0.90 (0.88-0.92)	0.91 (0.77-1.05)	0.87 (0.74-0.89)
<b>Senzitivnost</b>	96.08% (86.54% - 99.52%)	93.1% (83.27% - 98.09%)	82.21% (62.48% - 88.96%)
<b>Specifičnost</b>	88.89% (65.29% - 98.62%)	88.89% (51.75% - 99.72%)	98% (2.5% - 100.0%)
<b>PPV</b>	96.08% (86.54% - 99.52%)	98.18% (90.28% - 99.95%)	84.1% (63.21% - 92.6%)
<b>NPV</b>	88.89%	66.67%	51.87%

	(65.29% - 98.62%)	(34.89% - 90.08%)	(12.32% - 99.24%)
--	-------------------	-------------------	-------------------

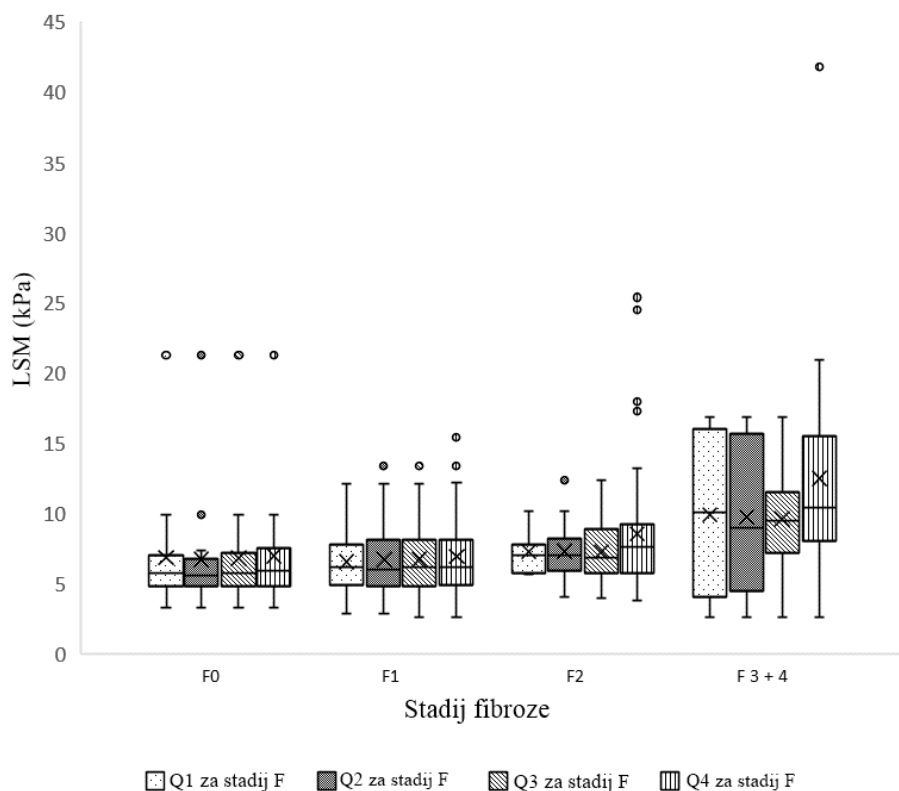
\*AUROC – površina ispod dijagrama (*area under the curve*); PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV – negativna prediktivna vrijednost

### 3.3. Utjecaj sonde, vrijednosti ALT-a, AST-a, CAP-a i steatoze na LSM

Nadalje, istražili smo utjecaj sonde, vrijednosti transaminaza (AST i ALT) i gradusa steatoze na vrijednosti LSM-a. Na slici 4 prikazan je boxplot korelacije LSM i stadija fibroze slojevito prema tipu sonde. Na slici 5 prikaz je boxplota LSM-a sa slojevitim polukvalitativni postotkom kvartila steatoze. Kao što vidimo na slikama 3A i 3B, nismo pronašli statistički značajnu razliku između tipa sonde i stadija fibroze ili LSM-a, niti između kvartila steatoze i LSM-a.



Slika 4: Boxplot LSM-a i stadija fibroze slojevito prikazan prema tipu sonde koja je korištena u pregledu. Za svakog pacijenta koristili smo ili M ili XL sondu ovisno o automatskom odabiru FibroScan®-a, nakon analize nije uočena statistički značajna razlika ( $p > 0.05$ ; Friedman ANOVA i Kendall koeficijent slaganja).



Slika 5. Boxplot LSM-a i stadija fibroze slojevito prikazana prema polukvalitativnim postotkom kvartila steatoze. Boxplot je prikazan slojevito prema vrijednostima steatoze – za svaki stadij fibroze, pacijenti su podijeljeni prema kvartilima steatoze. ( $p = 0.33$ ; Friedman ANOVA i Kendall koeficijent slaganja).

Pored toga, ako LSM smatramo zavisnom varijablom u višestrukoj regresijskoj analizi dobivamo slijedeće rezultate:  $R = 0.33$  i  $R^2 = 0.11$  sa  $p < 0.01$ . U oba slučaja, analizom korelacije jedne ( $r = 0.3$ ) ili više zavisnih varijabli sa LSM-om, gradus steatoze značajno korelira sa LSM-om ( $r = 0.3$  i  $p = 0.001$ ). Druge zavisne varijable koje smo analizirali su tip sonde, CAP, ALT i AST. CAP

i ALT su također značajno korelirali sa LSM-om, ali jedino u kombinaciji. U multivarijantnim testovima, Shapiro-Wilk test, dobili smo rezultat 0.022 i  $p < 0.05$ .

### *3.4. Procjena fibroze na temelju biokemijskih markera*

Naš idući cilj bio je istražiti točnost markera stanične smrti, M30 i M65, FIB-4 i APRI bodovnih sustava u detekciji fibroze i njenih stadija. Receptore stanične smrti M30 i M65 vadili smo kod 120 pacijenata. Pri graničnoj vrijednosti od 194 U/l za dijagnozu stadija fibroze  $F \geq F1$ , AUROC za M30 je bio 0.80 (0.72-0.89), dok su senzitivnost i specifičnost bili 89% i 80.56%. pri graničnoj vrijednosti 238 U/l za  $F \geq F2$ , AUROC je bio 0.89 (95%CI, 0.69-100), dok su senzitivnost i specifičnost bili 89,9% i 86,36%. konačno, pri graničnoj vrijednosti od 280 U/l za  $F \geq F3$ , AUROC je bio 0.80 (95%CI, 0.76-0.82), a senzitivnost i specifičnost iznosili su 94.74% i 85.71%. Dodatno, analizirali smo prikladnost M65 za dijagnosticiranje različitih stadija fibroze. Pri graničnoj vrijednosti 293 U/l za  $F \geq F1$  AUROC je 0.80 (95% CI 0.76–0.83), specifičnost 86.54%, a senzitivnost 90%. Nadalje, pri graničnoj vrijednosti od 340 U/l za dijagnozu  $F \geq F2$ , AUROC je 0.80 (0.79–0.80), sa senzitivnosti 92.68%, a specifičnosti 89.5%, a pri graničnoj vrijednosti 382 U/l za stadij fibroze  $F \geq F3$ , AUROC je također 0.80 (0.76–0.82), sa senzitivnosti 95.24% i specifičnosti 87.8%. Naš idući cilj bio je analizirati kombinaciju M30 i M65 za dijagnosticiranje različitih stadija fibroze. Kod granične vrijednosti od 194 U/l za M30 i 284 U/l za M65 za dijagnozu  $F \geq F1$ , AUROC receptora stanične smrti je 0.94 (95%CI 0.93-0.94), a senzitivnost i specifičnost 90.32 % i 92.86%. Za graničnu vrijednost 238 U/l za M30 i 340 U/l za M65 za dijagnosticiranje  $F \geq F2$ , AUROC je 0.97 (95%CI, 0.97-0.98), dok su senzitivnost i specifičnost 92.31% i 100%. Konačno, kod graničnih vrijednosti 194 U/l za M30 i 382 U/l za M65 za dijagnosticiranje  $F \geq F3$ , AUROC je 0.99 (95%CI, 0.92-1.07), a senzitivnost i specifičnost

su 94.12% i 100%. Zbog ograničenja duljine rada, u tablici 4 prikazali smo samo kombinirane rezultate M30 i M65.

Tablica 4. Dijagnostička pouzdanost M30 i M65 za stadij fibroze jednak ili veći od 1, 2 ili 3

M30 + M65							
	Granična vrijednost		AUROC (95%CI)	Sp	Se	PPV	NPV
F≥F1	M30=194 M65=284	Se≥0.9	0.94 (0.93-0.94)	90.32% (74.25% -97.96%)	92.86% (66.13% - 9.82%)	96.55% (82.24% - 9.91%)	81.25% (54.35% - 5.95%)
F≥F2	M30=238 M65=340	Se≥0.9	0.97 (0.97-0.98)	92.31% (63.97% - 9.81%)	100.0% (63.06% - 00.0%)	100.0% (73.54% - 00.0%)	88.89% (51.75% - 9.72%)
F≥F3	M30=194 M65=382	Se≥0.9	0.99 (0.92-1.07)	94.12% (71.31% - 9.85%)	100.0% (54.07% -100.0%)	100.0% (79.41% - 00.0%)	85.71% (42.13% - 9.64%)

\* AUROC – površina ispod krivulje; Sp – specifičnost; Se – senzitivnost; PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV - negativna prediktivna vrijednost

Nadalje, analizom prikladnosti APRI bodovnog sustava za otkrivanje stadija fibroze pri graničnoj vrijednosti 1.06 za dijagnozu fibroze F≥F1, AUROC APRI sustava je 0.80 (0.78-0.81), dok su senzitivnost i specifičnost 92.31% i 45.37%. pri graničnoj vrijednosti 1.28 za F≥F2,

AUROC je 0.93 (95%CI, 0.91-0.95), senzitivnost 92.31%, a specifičnost 95.92%. Konačno, za graničnu vrijednosti 1.52 za  $F \geq F3$  AUROC je 0.91 (95%CI, 0.74-1.09), dok su senzitivnost i specifičnost 85.71% i 94.12%. Rezultati su prikazani u tablici broj 5.

Tablica 5. Dijagnostika pouzdanost APRI bodovnog sustava za stadij fibroze jednak ili veći 1, 2 ili 3

	<b>F<math>\geq</math>F1</b>	<b>F<math>\geq</math>F2</b>	<b>F<math>\geq</math>F3</b>
<b>Granična vrijednost</b>	<b>0.4144</b>	<b>0.4639</b>	<b>0.5214</b>
<b>Senzitivnost</b>	60.61% (51.7%-69%)	70.89% (59.6%-80.6%)	79.49% (63.5%-90.7%)
<b>Specifičnost</b>	42.42% (25.5%-60.8%)	61.63% (50.5%-71.9%)	65.87% (56.9%-74.1%)
<b>PPV</b>	80.8% (71.7%-88%)	62.9% (52.0%-72.9%)	41.9% (30.5%-53.9%)
<b>NPV</b>	21.2% (12.1%-33.0%)	69.7% (58.1%-79.8%)	91.2% (83.4%-96.1%)
<b>AUROC (95%CI)</b>	0.569 (0.490-0.646)	0.703 (0.627-0.772)	0.739 (0.665-0.804)

\*PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV – negativna prediktivna vrijednost; AUROC – površina ispod krivulje

Kod analize FIB-4 bodovnog sustava za detekciju pojedinih stadija fibroze, našli smo da najveću točnost ima za dijagnozu fibroze  $F \geq F2$ , pri graničnoj vrijednosti 2.74, sa AUROC-om 0.85 (95% CI 0.85–0.86), senzitivnosti 84.85% i specifičnosti 98.53%. Točnost je nešto niža pri nižim vrijednostima fibroze, pri graničnoj vrijednosti 1.37 za  $F \geq F1$ , sa AUROC-om 0.81 (0.71–0.91), senzitivnosti 84.85% i specifičnosti 100.0%. Točnost je niža i za  $F \geq F3$ , na graničnoj vrijednosti 3.91, AUROC je 0.80 (0.75–1.55), a senzitivnost i specifičnost iznose 85% i 96.5%. Rezultati su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Dijagnostička pouzdanost FIB-4 za stadij fibroze jednak ili veći od 1, 2 ili 3

	<b>F<math>\geq</math>F1</b>	<b>F<math>\geq</math>F2</b>	<b>F<math>\geq</math>F3</b>
<b>Granična vrijednost</b>	<b>1.3895</b>	<b>1.5455</b>	<b>1.8137</b>
<b>Senzitivnost</b>	47.33% (38.5%- 56.2%)	50.63% (39.1%- 62.1%)	58.97% (42.1%- 74.4%)
<b>Specifičnost</b>	81.82% (64.5%- 93.0%)	81.18% (71.2%- 88.8%)	84% (76.4%- 89.9%)
<b>PPV</b>	91.2% (81.8%- 96.7%)	71.4% (57.8%- 82.7%)	53.5% (37.7%- 68.8%)



<b>NPV</b>	28.1% (19.4%- 38.2%)	63.9% (54.1%- 72.9%)	86.8% (79.4%- 92.2%)
<b>AUROC (95%CI)</b>	0.634 (0.556- 0.708)	0.638 (0.559- 0.711)	0.68 (0.602- 0.705)

\*PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV – negativna prediktivna vrijednost; AUROC – površina ispod krivulje

Nadalje analizirali smo kombinaciju elastografskih parametara fibroze (LSM) i biokemijski markera (receptora stanične smrti M30 i M65) na utjecaj dijagnosticiranja različitih stadija fibroze. Pronašli smo najveću točnost pri dijagnosticiranju prvog stadija fibroze  $F \geq F1$ , sa AUROC-om 0.99 (95% CI 0.98–1.01), senzitivnosti 100% i specifičnosti 99,01% za graničnu vrijednost LSM-a 9 kPa. Točnost je nešto niža kod viših vrijednosti fibroze, sa AUROC-om 0.88 (0.86–0.89) za  $F \geq F2$ , senzitivnosti 100% i specifičnosti 99.48% za graničnu vrijednost 9.6 kPa i AUROC-om 0.96 (0.93–0.98) za  $F \geq F3$ , senzitivnosti 93,75% i specifičnosti 98,41% pri graničnoj vrijednosti 10,5 kPa. Svi rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Dijagnostička pouzdanost kombinacije M30, M65 i LSM-a na stadij fibroze veći ili jednak 1, 2 ili 3

	<b><math>F \geq F1</math></b>	<b><math>F \geq F2</math></b>	<b><math>F \geq F3</math></b>
<b>Granične vrijednosti</b>	<b>(Se<math>\geq</math>90%)</b>	<b>(Se<math>\geq</math>90%)</b>	<b>(Se<math>\geq</math>80%)</b>
LSM (kPa)	LSM=9 M30=199	LSM=9,6 M30=245	LSM=10.5 M30=281

M30, M65 (U/l)	M65=300	M65= 335	M65=355
<b>AUROC</b> <b>(95%CI)</b>	0.99 (0.98-1.01)	0.88 (0.86-0.89)	0.96 (0.93-0.98)
<b>Se</b>	100.0% (54.07% - 100.0%)	100.0% (2.5% - 100.0%)	93.75% (69.77% - 99.84%)
<b>Sp</b>	99.01% (94.61% - 99.97%)	99.48% (97.16% - 99.99%)	98.41% (94.38% - 99.81%)
<b>PPV</b>	85.71% (42.13% - 99.64%)	50.0% (1.26% - 98.74%)	88.24% (63.56% - 98.54%)
<b>NPV</b>	100.0% (96.38% - 100.0%)	100.0% (98.11% - 100.0%)	99.2% (95.62% - 99.98%)

\*Se – senzitivnost; Sp – specifičnost; PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV - negativna prediktivna vrijednost

### 3.5. Evaluacija NASH-a temeljena na biokemijskim markerima i elastografiji

Naš idući cilj je bio istražiti prikladnost biokemijskih markera (receptora stanične smrti M30 i M65) i elastografskih parametara steatoze (CAP) i fibroze (LSM) u detekciji NASH-a.

Kod granične vrijednosti 270 U/l M30 za dijagnozu NASH-a (NAS bodovni sustav  $\geq 5$ ), AUROC je 0.80 (0.54-1.05), dok su senzitivnost i specifičnost 80.9% i 69.84%. Nadalje, kod granične vrijednosti 392 U/l M65 za dijagnozu NASH-a (NAS bodovni sustav  $\geq 5$ ), AUROC je 0.79 (95%CI, 0.70-0.88), dok su senzitivnost i specifičnost 86.67% i 92.86%. Dodatno, analizom kombinacije M30 i M65 u svrhu dijagnosticiranja NASH-a (NAS bodovni sustav  $\geq 5$ ), našli smo

da granična vrijednost M30 od 270 U/l i M65 392 U/l ima AUROC 0.81 (95% CI 0.76–0.86), senzitivnost 100% i specifičnost 33,33%. Rezultati su prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Dijagnostička pouzdanost M30 i M65 za postojanje NASH-a; NAS bodovni sustav veći ili jednak 5

	<b>M30</b>	<b>M65</b>	<b>Kombinacija</b>
	<b>NAS bodovni sustav <math>\geq 5</math></b>	<b>NAS bodovni sustav <math>\geq 5</math></b>	<b>NAS bodovni sustav <math>\geq 5</math></b>
	M30 (U/l)	M65 (U/l)	Kombinacija (M30 and M65 in U/l)
<b>Granične vrijednosti</b>	270	392	m30= 270  m65=392
	Se $\geq$ 0.8	Se $\geq$ 0.8	Se $\geq$ 0.8
<b>AUROC (95%CI)</b>	0.8 (0.54-1.05)	0.79 (0.70-0.88)	0.81 (0.76-0.86)
<b>Se</b>	80.95% (58.09% - 94.55%)	86.67% (69.28% - 96.24%)	100.0% (63.06% - 100.0%)
<b>Sp</b>	69.84% (61.03% - 77.69%)	92.86% (66.13% - 99.82%)	33.33% (0.84% - 90.57%)
<b>PPV</b>	30.91% (19.14% - 44.81%)	96.3% (81.03% - 99.91%)	80.0%(44.39% - 97.48%)

<b>NPV</b>	95.65% (89.24% - 98.8%)	76.47% (50.1% - 93.19%)	100.0% (2.5% - 100.0%)
------------	-------------------------	-------------------------	------------------------

\*Se – senzitivnost; Sp – specifičnost; PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV - negativna prediktivna vrijednost

Ispitali smo i prikladnost CAP-a u dijagnosticiranju NASH-a (NAS bodovni sustav  $\geq 5$ ). AUROC je bio 0.76 (95%CI 0.61-0.75) za graničnu vrijednost 385 dB/m, dok su senzitivnost i specifičnost bili 52.94% i 78.22%. Nadalje ispitali smo i utjecaj LSM-a na NASH (NAS bodovni sustav  $\geq 5$ ). Pri graničnoj vrijednosti 9,4 kPa, AUROC je 0.77 (95%CI, 0.67-0.76), dok su senzitivnost i specifičnost 62.16% i 66.97%.

#### 4. RASPRAVA

Rastuća epidemija pretilosti i metaboličkog sindroma učinili su NAFLD najčešćom kroničnom bolesti jetre s prevalencijom 20 – 40% (18). Danas smatramo NAFLD jetrenom manifestacijom multisistemskog poremećaja povezanom s pretilosti koji uključuje dijabetes melitus tip 2, kardiovaskularne bolesti, kroničnu bubrežnu bolest i ekstrahepatične karcinome. Pravovremeno otkrivanje fibroze jetre od iznimne je važnosti kad se u obzir uzme velika prevalencija NAFLD-a za koju se, uz veliku učestalost pretilosti i metaboličkog sindroma, očekuje da će tek rasti u idućih par godina. Pravodobno detektiranje fibroze je još važnije s obzirom da će NAFLD uskoro postati vodeći uzrok hepatocelularnog karcinoma i ciroze jetre, a fibroza jetre je glavni pokazatelj napredovanja bolesti jetre, uz povećan rizik razvoja vanhepatičkih bolesti. Upravo zbog velike učestalosti NAFLD-a, nemoguće je invazivno (biopsijom jetre) pratiti toliko veliku skupinu pacijenata, stoga trebamo pribjegavati neinvazivnim metodama u svakodnevnoj kliničkoj praksi (1-5, 18). Važna, zasad nezadovoljena, potreba u kontekstu NAFLD-a je neinvazivni brzi test koji će pomoći u detekciji NAFLD pacijenata sa značajnom fibrozom (19). Europska udruga za proučavanje jetre (eng. *European Association for the Study of the Liver*, EASL) 2015. godine objavila je da su biokemijski markeri (analiza krvi), kao i LSM manje istraženi u NAFLD-u nego u hepatitisu C i u budućnosti bi ih trebali više analizirati u kontekstu NAFLD-a (20).

U našoj studiji, vrijednosti CAP-a su rasle sa porastom gradusa steatoze i uočena je značajna razlika između CAP-a u steatozi gradusa 1 (S1) i steatozi gradusa 3 (S3), kao i između CAP-a u steatozi gradusa 2 (S2) i S3. U našoj studiji nismo imali pacijente sa S0 gradusom steatoze (bez histološki dokazane steatoze jetre) zbog toga što je biopsija jetre učinjena samo onim pacijentima koji su imali jednu ili više komponenti metaboličkog sindroma, „svijetlu jetru“ na ultrazvučnom

pregledu i povišen CAP (sa ili bez povišenog LSM-a). Naše granične vrijednosti CAP-a za sva tri histološka gradusa steatoze slični su rezultatima nedavno objavljene studije (8). Ipak, za razliku od gore spomenute studije, gdje su granične vrijednosti CAP-a za S1-3 302dB/m, 331dB/m i 337dB/m, pri čemu su granične vrijednosti za S2 i S3 bile vrlo blizu, naše su relativno razdvojene i za S1-3 iznose 296dB/m, 327dB/m i 368 dB/m. Značajno, Eddowes PJ i sur. (8) u svojoj studiji istaknuli su da su FibroScan® i CAP pouzdani alati za neinvazivno ocjenjivanje steatoze sa visokom senzitivnosti i specifičnosti, te pozitivnom prediktivnom vrijednosti >90%. Iako je negativna prediktivna vrijednost CAP-a za S1 samo 59.09%, za S2 i S3 je >80%. Iz toga zaključujemo da korištenjem CAP-a u svakodnevnoj kliničkoj praksi, onda kada je CAP > 320dB/m, s velikom vjerojatnošću možemo isključiti umjerenu i značaju steatozu. Naše granične vrijednosti CAP-a za S1-3 usporedive su s vrijednostima Eddowesa PJ-a i sur., ali za razliku od njihovih i naših, granične vrijednosti CAP-a u studiji Siddiqui MS i sur. (19), koja je također nedavno objavljena, bile su nešto niže za pojedine graduse steatoze. Te vrijednosti su više usklađene s početnom CAP studijom objavljenom 2012. godine (13) gdje su granične vrijednosti CAP-a za graduse steatoze S1-3 niže i procijenjene su na 238dB/m, 259dB/m i 292dB/m. Razlog iza nižih vrijednosti CAP-a za pojedine graduse steatoze vjerojatno leži u činjenici da su u studiji sudjelovali i pacijenti sa kroničnim jetrenim bolestima različite etiologije; 618 pacijenata sa hepatitisom C, 133 s hepatitisom B, 74 s alkoholnom bolesti jetre i 96 NAFLD pacijenata (13). Osim što može isključiti umjerenu i značaju steatozu, serijskim mjerenjima, CAP je koristan za praćenje pacijenata nakon modifikacije štetnih životnih navika, gubljenja na težini, uvođenja određenih lijekova ili nakon barijatrijske operacije (8). Nadalje, što se tiče povezanosti LSM-a sa histološkim stadijima fibroze, naša analiza je pokazala statistički značajnu razliku u bolesnika bez fibroze i onih sa stadijem F3/4 fibroze. S obzirom da smo imali

samo 3 pacijenta sa F4 stadijem fibroze, stadije F3 i F4 smo analizirali zajedno. Naše granične vrijednosti za  $F \geq F1$ ,  $F \geq F2$  i  $F \geq F3/4$  su 8.5kPa, 9.5kPa i 13.6kPa, što pokazuje jasan porast vrijednosti LSM-a s porastom stadija fibroze. Uz gore navedene granične vrijednosti, nađeno je da senzitivnost iznosi čak 96.08% za  $F \geq F1$ , 93.1% za  $F \geq F2$  i 82.21% za  $F \geq F3$ , sa odličnom PPV (>90%) za  $F \geq F1$  i  $F \geq F2$ , dok je za  $F \geq F3$  iznosila 84.1%. NPV za  $F \geq F1$  je vrlo dobra, za  $F \geq F2$  zadovoljavajuća i nešto niža za  $F \geq F3$ . Slične granične vrijednosti utvrdili su Eddowes PJ i sur. (8), samo sa višom NPV za  $F \geq F3$ , što je vjerojatno zbog manjeg broja pacijenata sa F3/4 stadijem fibroze u našoj studiji (13.1%) u usporedbi s njihovom (37%). Na temelju naših rezultata, ali i rezultata Eddowesa PJ i sur. (8), ali i drugih autora (21-25), LSM je zadovoljavajući neinvazivni marker u otkrivanju značajne (F2) i uznapredovale (F3) fibroze. Ovo nam može pomoći u odluci koji pacijenti trebaju daljnju obradu, biopsiju jetre, s obzirom da je fibroza jetre bitan faktor u progresiji jetrenih bolesti, kao i faktor u razvoju kroničnih ekstrahepatičnih komplikacija povezanih sa NAFLD-om. Također, LSM možemo koristiti za longitudinalno praćenje progresije jetrenih bolesti. Prema raniji studijima, stupanj steatoze, tip sonde i upalni procesi u jetri utječu na vrijednosti LSM-a (8,26,27). Na primjer, Petta S. i sur. (27) u svom istraživanju 2017. godine analizirali su 324 NAFLD pacijenta. Dokazali su da CAP i steatoza utječu na točnost LSM-a. Zaključili su da kod pacijenata s NAFLD-om uvijek treba uzimati u obzir vrijednosti CAP-a kako bi se izbjeglo precjenjivanje steatoze utvrđene transijentnom elastografijom (27). Za razliku od njih, druga nedavna studija koja je obuhvatila sličan broj bolesnika s NAFLD-om nije pokazala utjecaj CAP-a i steatoze na točnost LSM-a (8). Na temelju naše analize, nije bilo razlike u graničnim vrijednostima ovisno o vrsti sonde (M ili XL), za razliku od stupnja steatoze, gdje su visoke vrijednosti CAP-a i ALT-a utjecale na vrijednosti LSM-a, čak su i s malim koeficijentom korelacije dostigle statističku značajnost. Ovi

podaci ukazuju da nam treba još istraživanja na ovu temu i veće kohorte, zbog toga što su trenutni podaci o povezanosti točnosti LSM-a i steatoze, temeljeni na dvije velike studije, ali i našim rezultatima, još uvijek kontroverzni.

Nadalje, analizirali smo mogli li receptori stanične smrti M30 i M65 biti korisni u detektiranju pojedinih stadija fibroze jetre. Receptori stanične smrti M30 i M65 pojedinačno imaju ograničenu sposobnost razlikovanja stadija jetrene fibroze, međutim ako ih se koristi u kombinaciji, s graničnim vrijednostima za M30 i M65 194 U/l i 284 U/l za  $F \geq F1$ , 238 U/l i 340 U/l za  $F1 \geq F2$ , 194 U/l i 382 U/l za  $F \geq F3$ , možemo s velikom sigurnošću isključiti značajnu i uznapredovalu fibrozu. Značajno, prema graničnim vrijednostima PPV za  $F \geq F2$  i  $F \geq F3$  iznosi 100%, a NPV >80%. Također, analizirali smo FIB-4 i APRI bodovne sustave u isključivanju značajne i uznapredovale fibroze. APRI bodovni sustav pri graničnim vrijednostima 1.28 (za  $F \geq F2$ ) i 1.52 (za  $F \geq F3$ ) ima zadovoljavajuću PPV i NPV. U nedavno objavljenoj studiji (10), granična vrijednost APRI bodovnog sustava 0.45 ima 58% PPV i 96% NPV za signifikantnu fibrozu. Naše granične vrijednosti za  $F \geq F2$  i  $F \geq F3$  su više nego u prethodno spomenutoj studiji, ali i sa boljom PPV i NPV. Dodatno, i FIB-4 bodovni sustav ima više granične vrijednosti u usporedbi s drugim studijama (10), ali i zadovoljavajuću PPV i NPV za  $F \geq F2$  i  $F \geq F3$ . Prema tome, zaključujemo da su biokemijski i krvni markeri vrlo dobre mode isključivanja značajne i uznapredovale fibroze jetre (F2 i F3) što je u od iznimne važnosti u javnozdravstvenom kontekstu. Rezultati FIB-4 i APRI bodovnih sustava se lako mogu izvući iz rutinskih laboratorijskih testova te na temelju njih liječnici obiteljske medicine mogu lako razlučiti koje NAFLD pacijente poslati na daljnju gastroenterološku obradu. Kombinirani M30 i M65 mogu se koristiti za isključenje značajne i uznapredovale fibroze, ali zbog visokih troškova njihove analize imaju loš omjer koristi i troška. Prema preporukama EASL-a iz 2015. preporučuje se



kombinacija slikovnih metoda dijagnostike i laboratorijskih ispitivanja kako bi se isključila značajna fibroza (20). Iduće smo istražili kombinaciju LSM-a i receptora stanične smrti (M30 i M65) u detekciji pojedinih stadija fibroze. Granična vrijednost LSM-a 9 kPa, M30 199 U/l i M65 300 U/l za  $F \geq F1$  ima PPV 85% i NPV 100%, dok  $F \geq F3$  sa graničnim vrijednostima LSM-a od 10.5 kPa, M30 od 281 U/l i M65 od 355 U/l ima PPV 88% i NPV 99%. Za  $F \geq F2$  sa graničnim vrijednostima LSM-a od 9.6 kPa, M30 od 245 U/l i M65 335 U/l, PPV je nešto niža, 50%, dok je NPV 100%. Prema našim rezultatima, kombinirana upotreba receptora stanične smrti, M30 i M65, i elastografskih parametara fibroze ne povećava učinkovitost neinvazivnih metoda u otkrivanju značajne i uznapredovale fibroze jetre. Na kraju smo analizirali učinkovitost M30 i M65 u otkrivanju nekroinflamatornog oblika NAFLD-a - NASH. Kada se kombiniraju, ovi biokemijski markeri imaju 100% senzitivnost pri graničnim vrijednostima 270 U/l za M30 i 392 U/l za M65, sa zadovoljavajućom PPV i NPV od 100% i 80%, iako imaju nisku specifičnost. Prema tome, naši rezultati sugeriraju da bi uz pomoći ovih markera mogli detektirati NASH kod većine pacijenata s NAFLD-om, te bi onda te pacijente mogli slati na daljnju obradu, tj. biopsiju jetre. Ovi rezultati su izrazito važni, zbog toga što su ranije studije pokazale da je prisutnost NASH-a faktor rizika za razvoj ekstrahepatičkih manifestacija NAFLD-a (kardiovaskularne bolesti, kronične bolesti bubrega, dijabetes melitus tip 2) (1-5). Očekivano, ali i u skladu s drugim istraživanjima (8), CAP i LSM se nisu pokazali kao zadovoljavajući u otkrivanju NASH-a.

## 5. ZAKLJUČAK

Naše istraživanje ima određene nedostatke, mali uzorak pacijenata sa F3/4 stadijem fibroze, što je vjerojatno razlog niske NPV za LSM u F3/4 stadiju fibroze u usporedbi sa drugim studijama. Također, nismo radili ponovljena FibroScan® mjerenja u kratkom intervalu na istim pacijentima koja bi stvorila konzistentnije rezultate kao što je prikazano ranije.

Ipak, naša studija ima nekoliko prednosti poput uključivanja pacijenata s LSM IQR <30%. Također, koristili smo M ili XL sondu ovisno o preporuci FibroScan®-ovog automatskog alata za preporuku sonde, čime smo osigurali ispravne vrijednosti LSM-a i CAP-a te istovremeno pokazali da vrsta sonde nema utjecaj na LSM. Analizirali smo i elastografske parametre i biokemijske markere u otkrivanju pojedinih stadija fibroze jetre i pokazali da pomoću jednostavnih biokemijskih bodovnih sustava (eng. *score*), FIB-4 i APRI, liječnici u primarnoj zdravstvenoj zaštiti mogu isključiti značajnu fibrozu. Stoga na daljnju specijalističku gastroenterološku obradu i histološku evaluaciju mogu poslati samo one pacijente kojima to zaista i treba. Pokazali smo da je CAP zadovoljavajuća metoda u otkrivanju umjerene i značajne steatoze jetre te nam njegovo kontinuirano mjerenje omogućava praćenje rezultata liječenja. Također, LSM je zadovoljavajuća metoda detekcije signifikantne (F2) i uznapredovale (F3) fibroze jetre. Biokemijski markeri – receptori stanične smrti M30 i M65 također su zadovoljavajuće metode za otkrivanje fibroze i nekroinflamatornog oblika NAFLD-a, NASH. Glavni nedostatak ovih markera je njihova relativno visoka cijena, što ih čini neprikladnima u svakodnevnoj upotrebi na velikoj skupini bolesnika. Primjenom biokemijskih testiranja (APRI, FIB-4, kombinacije M30 i M65) i transijentne elastografije, možemo pravovremeno otkriti pacijente sa značajnim histološkim promjenama, kao i identificirati one kojima nije potrebna daljnja obrada (biopsija jetre) što bi trebalo rezultirati znatnim dugoročnim uštedama.

## 6. SAŽETAK

Uvod: Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) kronična je bolest jetre povezana s metaboličkim sindromom i njegovim komponentama. Jedna je od najčešćih kroničnih bolesti i rastući etiološki faktor za cirozu jetre i hepatocelularni karcinom te će u budućnosti postati glavna indikacija za transplantaciju jetre. Stoga je bitno da razvijemo neinvazivne metode detekcije i praćenja rizičnih pacijenata.

Cilj: Svrha ovog istraživanja je procjena dijagnostičke točnosti elastografskih parametara steatoze – CAP (eng. *controlled attenuation parameter*) i fibroze – LSM (eng. *liver stiffness measurement*) izmjerenih M ili XL FibroScan® sondom, biokemijskih markera (M30, M65, APRI i FIB-4) i njihovih kombinacija u usporedbi sa biopsijom jetre koja je zlatni standard u detekciji jetrene steatoze i fibroze, kao i nealkoholnog steatohepatitisa (NASH).

Metode: Ovo je retrospektivna studija u kojoj je sudjelovalo 146 pacijenata s NAFLD-om. Koristili smo Fibroscan® 502 Touch.

Rezultati: CAP je identificirao steatozu kod pacijenata s NAFLD-om sa AUROC vrijednostima 0.92 za  $S \geq S1$ , 0.8 za  $S \geq S2$ , 0.86 za  $S \geq S3$  s graničnim vrijednostima 296 dB/m, 327 dB/m i 368 dB/m. LSM je identificirao fibrozu kod NAFLD pacijenata s AUROC vrijednostima 0.90 za  $F \geq F1$ , 0.91 za  $F \geq F2$ , 0.87 za  $F \geq F3$  pri graničnim vrijednostima 8.5kPa, 9.5kPa i 13.6kPa. FIB-4, APRI i receptori stanične smrti M30 i M65 također su se pokazali korisnima u detekciji stadija fibroze.

Zaključak: Primjenom biokemijskih testiranja i transijentne elastografije možemo pravovremeno otkriti pacijente sa značajnim histološkim promjenama, kao i identificirati one kojima nije potrebna daljnja obrada (biopsija jetre) što bi trebalo rezultirati boljom skrbi za pacijente, ali znatnim dugoročnim uštedama.

KLJUČNE RIJEČI: biopsija, biokemijski markeri, transijentna elastografija, steatoza, fibroza, nealkoholni steatohepatitis, parametar steatoze, parametar fibroze, LSM, CAP

## 7. SUMMARY

**Introduction:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is chronic liver disease strongly associated with metabolic syndrome and its components. NAFLD is one of the most common chronic diseases and a growing etiological factor for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In the future, it will become the main indication for liver transplantation. Therefore, it is important to develop non-invasive methods of detection and monitoring of at-risk patients.

**Aim:** Aim of this study was to assess the diagnostic accuracy of elastographic parameters of steatosis (controlled attenuation parameter, CAP) and fibrosis (liver stiffness measurement, LSM) measured by either M or XL probes, biochemical markers (M30, M65, APRI and FIB-4) and their combination against liver biopsy which is a gold standard in detection of liver steatosis and fibrosis, as well as nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

**Methods:** This study was retrospective study that included 146 nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients. We used the Fibroscan® 502 Touch operating software.

**Results:** We found that CAP identified NAFLD patients with steatosis with an AUROC of 0.92 for  $S \geq S1$ , 0.8 for  $S \geq S2$ , and 0.86 for  $S \geq S3$ , with the corresponding cutoff values 296 dB/m, 327 dB/m and 368 dB/m, respectively. LSM identified NAFLD patients with fibrosis with AUROCs of 0.90 for  $F \geq F1$ , 0.91 for  $F \geq F2$  and 0.87 for  $F \geq F3$ , with the cutoff values of 8.5kPa, 9.5kPa and 13.6kPa, respectively. FIB-4, APRI and cell death markers M30 and M65 were also found to be useful in detecting each fibrosis stage.

**Conclusion:** With the application of both biochemical testing and transient elastography, we can timely detect patients with significant histological changes as well as identify those that do not require further workup (liver biopsy) which should result in better patient care and substantial long-term savings.

## 8. LITERATURA

1. Younossi Z, Koenig A, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
2. Brunt E, Wong V, Nobili V, Day C, Sookoian S, Maher J et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1(1).
3. Mikolasevic I, Filipec-Kanizaj T, Mijic M, Jakopcic I, Milic S, Hrstic I et al. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation - Where do we stand?. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24(14):1491-1506.
4. Mikolasevic I, Milic S, Turk Wensveen T, Grgic I, Jakopcic I, Stimac D et al. Nonalcoholic fatty liver disease - A multisystem disease?. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(43):9488.
5. Brouha S, Nguyen P, Bettencourt R, Sirlin C, Loomba R. Increased severity of liver fat content and liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease correlate with epicardial fat volume in type 2 diabetes: A prospective study. *European Radiology*. 2017;28(4):1345-1355.
6. Dulai P, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop L, Younossi Z et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557-1565.
7. Nampoothiri R, Duseja A, Rathi M, Agrawal S, Sachdeva N, Mehta M et al. Renal Dysfunction in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease is Related to the Presence

- of Diabetes Mellitus and Severity of Liver Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2019;9(1):22-28.
8. Eddowes P, Sasso M, Allison M, Tsochatzis E, Anstee Q, Sheridan D et al. Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(6):1717-1730.
  9. Mikolasevic I, Orlic L, Franjic N, Hauser G, Stimac D, Milic S. Transient elastography (FibroScan®) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand?. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(32):7236.
  10. Kolhe K, Amarapurkar A, Parikh P, Chaubal A, Chauhan S, Khairnar H et al. Aspartate transaminase to platelet ratio index (APRI) but not FIB-5 or FIB-4 is accurate in ruling out significant fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in an urban slum-dwelling population. *BMJ Open Gastroenterology*. 2019;6(1):e000288.
  11. Sun W, Cui H, Li N, Wei Y, Lai S, Yang Y et al. Comparison of FIB-4 index, NAFLD fibrosis score and BARD score for prediction of advanced fibrosis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis study. *Hepatology Research*. 2016;46(9):862-870.
  12. Joka D, Wahl K, Moeller S, Schlue J, Vaske B, Bahr M et al. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;55(2):455-464.

13. Sasso M, Miette V, Sandrin L, Beaugrand M. The controlled attenuation parameter (CAP): A novel tool for the non-invasive evaluation of steatosis using Fibroscan®. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2012;36(1):13-20.
14. Tapper E, Challies T, Nasser I, Afdhal N, Lai M. The Performance of Vibration Controlled Transient Elastography in a US Cohort of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2016;111(5):677-684.
15. Glenda Fenili Amorim T, Jönck Staub G, Lazzarotto C, Pacheco Silva A, Manes J, da Graça Ferronato M et al. Validation and comparison of simple noninvasive models for the prediction of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Annals of Hepatology*. 2012;11(6):855-861.
16. Wai C. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–526.
17. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–1321.
18. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
19. Siddiqui MS, Vuppalanchi R, Van Natta ML, Hallinan E, Kowdley KV, Abdelmalek M, et al. Vibration-Controlled Transient Elastography to assess fibrosis and steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology Hepatology*. 2019;17:156-163.



20. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of Hepatology*. 2015;63(1):237–264.
21. Vuppalanchi R, Siddiqui MS, Van Natta ML, Hallinan E, Brandman D, Kowdley K, et al. Performance characteristics of vibration-controlled transient elastography for evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2018;67:134-144.
22. Lédighen VD, Hiriart J-B, Vergniol J, Merrouche W, Bedossa P, Paradis V. Controlled Attenuation Parameter (CAP) with the XL Probe of the Fibroscan®: A Comparative Study with the M Probe and Liver Biopsy. *Digestive Diseases and Sciences*. 2017;62(9):2569–2577.
23. Chan W-K, Mustapha NRN, Wong GL-H, Wong VW-S, Mahadeva S. Controlled attenuation parameter using the FibroScan® XL probe for quantification of hepatic steatosis for non-alcoholic fatty liver disease in an Asian population. *United European Gastroenterology Journal*. 2016;5(1):76–85.
24. Loong TC, Wei JL, Leung JC, Wong GL, Shu SS, Chim AM, et al. Application of the combined FibroMeter vibration-controlled transient elastography algorithm in Chinese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017;32:1363-1369.
25. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, Hiriart J-B, Lannes A, Bail BL, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016;65(3):570–8.

26. Kim SU, Kim JK, Park YN, Han K-H. Discordance between Liver Biopsy and FibroScan® in Assessing Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis B: Risk Factors and Influence of Necroinflammation. PLoS ONE. 2012;7(2).
27. Petta S, Wong VW-S, Cammà C, Hiriart J-B, Wong GL-H, Marra F, et al. Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values. Hepatology. 2016;65(4):1145–1155.

## 9. ŽIVOTOPIS

Anđela Lukić rođena je 1.8.1995. u Zadru, gdje je pohađala osnovnu i srednju školu. Nakon opće gimnazije, u akademskoj godini 2014./2015. upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

Tijekom studija aktivni je član studentske organizacije CroMSIC, sudjeluje i organizira brojne nacionalne, ali i internacionalne kongrese i skupove za studente medicine i mlade liječnike. U rujnu 2019. odlazi na studentsku razmjenu u Rusiju. Pod mentorstvom doc.dr.sc. Ivane Mikolašević, dr. med. sudjeluje u radu NAFLD ambulante i piše znanstvene radove. Aktivno se služi engleskim, a pasivno talijanskim jezikom.