

Діагностична цінність маркерів апоптозу при неалкогольній жировій хворобі печінки в дітей

Ю. М. Степанов^{id A,F}, Н. Ю. Завгородня^{id *A,C,D,E}, О. Ю. Завгородня^{id A,B,C,D},
В. Б. Ягмур^{id B,C}, О. М. Татарчук^{id B,C}, О. П. Петішко^{id B,C}

ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) – одна з найпоширеніших нозологічних форм у структурі хронічних дифузних захворювань печінки в дітей і дорослих у всьому світі. Рання діагностика форм НАЖХП, що здатні до швидкого прогресування, як-от неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ), у дітей набуває найважливішого значення, оскільки терапевтичне втручання саме на ранніх етапах захворювання створює унікальні можливості зворотного розвитку патологічних змін та відновлення структури й функцій печінки. Незважаючи на різноманіття діагностичних шкал та індексів, лабораторна діагностика НАЖХП у дітей потребує пошуку нових неінвазивних тестів та їхньої валідації.

Мета роботи – дослідити відмінності рівнів маркера апоптозу цитокератину-18 (СК18) та комбінованого розрахункового маркера МАСК-3 у дітей із неалкогольним стеатогепатитом, простим стеатозом печінки, надмірною вагою та ожирінням без стеатозу.

Матеріали та методи. У дослідження залучили 170 пацієнтів віком від 6 до 17 років. Середній вік хворих – $12,15 \pm 2,51$ року. За наявності стеатозу, стеатогепатиту, надмірної ваги та ожиріння пацієнтів поділили на 4 групи: перша – 37 хворих на НАСГ; друга – 53 пацієнти з простим стеатозом; третя – 65 осіб із надмірною вагою та ожирінням без стеатозу печінки; четверта (контрольна) – 15 дітей із нормальною вагою без стеатозу. Досліджували біохімічну гепатограму, показники вуглеводного обміну, а також СК18 імуноферментним методом із розрахунком індексу МАСК-3.

Результати. Середній рівень СК18 у дітей із НАСГ підвищувався в 1,6 раза ($p < 0,05$) порівняно з показниками дітей контрольної групи. Медіана СК18 хворих із НАСГ в 1,6 раза ($p < 0,05$) та 2,0 раза ($p < 0,05$) перевищувала показники 2 і 3 груп відповідно. Показники діагностичної точності порогового рівня СК18 87,4 У/л для діагностики НАСГ: чутливість – 81,8 %, специфічність – 70 %, AUC 0,736 ($p < 0,05$). Порівнюючи середні значення розрахункового індексу МАСК-3, виявили вірогідне підвищення цього показника в дітей із НАСГ порівняно з іншими групами ($p < 0,05$). Показники діагностичної точності порогового рівня МАСК-3 0,053 становили: чутливість – 90,9 %, специфічність – 81,6 %, AUC 0,958 ($p < 0,05$).

Висновки. У дітей із НАСГ зареєстрували вірогідне підвищення рівня СК18, а отже цей показник можна використовувати для ранньої неінвазивної діагностики НАСГ. Перевага розрахункового індексу МАСК-3 полягає у вищій діагностичній цінності та можливості його використання для стратифікації ризику несприятливого перебігу НАЖХП, що дасть змогу раціоналізувати визначення хворих, які потребують активного терапевтичного втручання.

Ключові слова: цитокератин-18, неалкогольна жирова хвороба печінки, неалкогольний стеатогепатит, діагностична точність, діти.

Патологія. 2020. Т. 17, № 3(50). С. 369-377

*E-mail: nzavgorodni75@gmail.com

Diagnostic accuracy of apoptosis markers in non-alcoholic fatty liver disease in children

Yu. M. Stepanov, N. Yu. Zavorodnia, O. Yu. Zavorodnia, V. B. Yahmur, O. M. Tatarchuk, O. P. Petishko

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is recognized as one of the most common chronic liver diseases in children and adults worldwide. Early diagnosis of rapidly progressive forms of NAFLD – non-alcoholic steatohepatitis (NASH) – is crucial, because therapeutic intervention in the early disease stages creates unique opportunities for the reversal of pathological changes and restoration of liver structure and function. Despite the variety of currently available diagnostic scales and indices, laboratory diagnosis of NAFLD in children requires new non-invasive tests and their validation.

Aim: To investigate the differences of cytokeratin-18 (CK18) and the combined marker MACK-3 levels in children with non-alcoholic steatohepatitis (NASH), simple hepatic steatosis, overweight and obese children without hepatic steatosis.

Materials and methods. The study included 170 patients aged 6 to 17 years. The mean age of patients was (12.15 ± 2.51) years. According to the presence of steatosis, steatohepatitis, overweight and obesity, patients were divided into 4 groups: the 1st group consisted of 37 patients with NASH, the 2nd group – 53 patients with simple steatosis, the 3rd group – 65 overweight and obese patients without hepatic steatosis, the 4th group (control) – 15 patients with normal weight without steatosis. Biochemical hepatogram, carbohydrate metabolism investigation, as well as CK18 enzyme-linked immunosorbent assay, were conducted with the MACK-3 calculation.

Results. The average level of CK18 in children with NASH increased by 1.6 times ($P < 0.05$) compared with children of the control group. The median CK18 level in patients with NASH was by 1.6 times ($P < 0.05$) and 2.0 times ($P < 0.05$) higher than in groups 2 and 3, respectively. The threshold level of CK18 for the diagnosis of NASH was 87.4 U/l: its sensitivity was 81.8 %, specificity 70 %, AUC 0.736 ($P < 0.05$). Calculated index MACK-3 revealed a significant increase in children with NASH compared with other groups ($P < 0.05$). Threshold level of MACK-3 for the diagnosis of NASH was 0.053: sensitivity – 90.9 %, specificity – 81.6 %, AUC 0.958 ($P < 0.05$).

Key words: cytokeratin-18, non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis, diagnostic accuracy, children.

Pathologia 2020; 17 (3), 369-377

Conclusions. Thus, in children with NASH, a significant increase in the CK18 level was found, which can be used for early non-invasive diagnosis of NASH in children. The advantage of the calculated index MACK-3 is the increase in diagnostic accuracy and the possibility of its use to stratify the risk of the progressive course of NAFLD, which will streamline the selection of patients for active therapeutic intervention.

Ключевые слова:
цитокератин-18
неалкогольная
жировая
болезнь печени,
неалкогольный
стеатогепатит,
диагностическая
точность, дети.

Патология. 2020.
Т. 17, № 3(50).
С. 369-377

Диагностическая ценность маркеров апоптоза при неалкогольной жировой болезни печени у детей

Ю. М. Степанов, Н. Ю. Завгородняя, О. Ю. Завгородняя, В. Б. Ягмур, О. М. Татарчук, О. П. Петишко

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – одна из самых распространенных нозологических форм в структуре хронических диффузных заболеваний печени у детей и взрослых во всем мире. Ранняя диагностика форм НАЖБП, способных к быстрому прогрессированию, в частности неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), у детей приобретает важнейшее значение, так как терапевтическое вмешательство именно на ранних этапах заболевания создает уникальные возможности обратного развития патологических изменений и восстановления структуры и функций печени. Несмотря на многообразие диагностических шкал и индексов, лабораторная диагностика НАЖБП у детей требует поиска новых неинвазивных тестов и их валидации.

Цель работы – изучить различия уровней маркера апоптоза цитокератина-18 (СК18) и комбинированного расчетного маркера MACK-3 у детей с неалкогольным стеатогепатитом, простым стеатозом печени, с избыточным весом и ожирением без стеатоза.

Материалы и методы. В исследование включены 170 пациентов в возрасте от 6 до 17 лет. Средний возраст пациентов – $12,15 \pm 2,51$ года. По наличию стеатоза, стеатогепатита, избыточного веса и ожирения пациентов поделили на 4 группы: первая – 37 пациентов с НАСГ; вторая – 53 больных с простым стеатозом; третья – 65 пациентов с избыточным весом и ожирением без стеатоза печени; четвертая (контрольная) – 15 детей с нормальным весом без стеатоза. Исследовали биохимическую гепатограмму, показатели углеводного обмена, а также СК18 иммуноферментным методом с расчетом индекса MACK-3.

Результаты. Средний уровень СК18 у детей с НАСГ повышался в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями детей контрольной группы. Медиана СК18 больных с НАСГ в 1,6 раза ($p < 0,05$) и 2,0 раза ($p < 0,05$) превышала показатели 2 и 3 групп соответственно. Показатели диагностической точности порогового уровня СК18 87,4 УЛ для диагностики НАСГ: чувствительность – 81,8 %, специфичность – 70 %, AUC 0,736 ($p < 0,05$). При сравнении средних значений расчетного индекса MACK-3 установлено достоверное повышение этого показателя у детей с НАСГ по сравнению с другими группами ($p < 0,05$). Показатели диагностической точности порогового уровня MACK-3 0,053 составили: чувствительность – 90,9 %, специфичность – 81,6 %, AUC 0,958 ($p < 0,05$).

Выводы. У детей с НАСГ отмечено достоверное повышение уровня СК18, а значит этот показатель может быть использован для ранней неинвазивной диагностики НАСГ. Преимущество расчетного индекса MACK-3 заключается в повышении диагностической ценности и возможности его использования для стратификации риска неблагоприятного течения НАЖБП, что позволит рационализировать отбор больных для активного терапевтического вмешательства.

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) – одна з найпоширеніших нозологічних форм у структурі хронічних дифузних захворювань печінки в усьому світі. За даними Європейського реєстру педіатричних пацієнтів із НАЖХП (2018), загальна поширеність захворювання в дитячій популяції сягає 7,5 %, що значною мірою пов'язано зі збільшенням поширеності ожиріння серед дітей (16–22 %) [1].

Неалкогольний стеатогепатит (НАСГ), морфологічним підґрунтям якого є лобулярне запалення, балонна дегенерація гепатоцитів, – несприятлива форма НАЖХП, що характеризується здатністю до швидкого прогресування, високою ймовірністю розвитку незворотних структурних змін, як-от фіброз і цироз печінки. Відсутність специфічних клінічних ознак захворювання, що призводить до пізнього звернення за медичною допомогою, стає перешкодою на шляху ранньої діагностики НАСГ у дітей. Так, під час первинної діагностики НАЖХП 10–25 % дітей мають 3–4 ступені фіброзу печінки [2], у підлітків на тлі морбідного ожиріння спостерігають істотно вищі ступені фіброзу порівняно з дорослими [3].

Нааявність фіброзу печінки є найсильнішим предиктором розвитку печінкових ускладнень і віддалених

наслідків захворювання в дорослих, а ступінь фіброзу – важливий фактор, що детермінує прогноз захворювання [4]. Швидкість прогресування структурних змін печінки може бути доволі високою в окремих хворих. За дворічний період спостереження Спілка дослідників з вивчення НАСГ (The Clinical Research Network in Nonalcoholic Steatohepatitis – NASH CRN) показала прогресування ступеня фіброзу у 25 % дітей, формування розвинутого фіброзу (>F2 за Metavir) у 20 % хворих [5]. Але критерії стратифікації хворих у групу ризику швидкого прогресування захворювання залишаються не визначеними. Отже, рання діагностика НАСГ, відбір хворих із ризиком несприятливого перебігу захворювання в дитячій практиці набувають надзвичайної актуальності.

Ступінь підвищення печінкових трансаміназ не є надійним маркером гістологічної активності запалення: в окремих випадках у дітей із нормальними або незначно підвищеними рівнями аланінамінотрансферази (АЛТ) можуть виявлятися високі ступені фіброзу печінки, тому орієнтування лише на рівні АЛТ призводить до неадекватного оцінювання ступеня пошкодження печінки [6].

Нині сформувався нагальна потреба пошуку безпечних та економічно ефективних діагностичних

альтернатив біопсії, яку вважають «золотим стандартом» для визначення активності запалення та стадії фіброзу печінки. Найбільшого розвитку в цьому напрямі набувають нові візуалізаційні технології (транз'єнтна, акустична імпульсна, зсувнохвильова, магнітно-резонансна еластографія), але їхнє застосування у клінічній практиці обмежується високою вартістю обладнання. Альтернативою стає ідентифікація потенційних нових лабораторних маркерів, що показують активність запалення, апоптозу, оксидативного стресу та фіброзу. З-поміж цих маркерів розрізняють ті, що спрямовані на підтвердження НАСГ, і ті, що призначені для виявлення й кількісного оцінювання фіброзу [7].

Результатом широкомасштабного співробітництва експертів із різних країн у проекті LITMUS (Liver Investigation: Testing Marker Utility in Steatohepatitis) стало створення цілого спектра біомаркерів і прогностичних шкал для діагностики НАЖХП, НАСГ і фіброзу печінки, а також для моніторингу за перебігом захворювання. Однак, незважаючи на доволі високу точність запропонованих маркерів і комбінованих шкал, можливість застосування цих моделей у педіатричних пацієнтів потребує підтвердження та зовнішньої валідації [8].

Апоптоз – один з основних молекулярних механізмів загибелі гепатоцитів у разі НАСГ. Індукція апоптозу при НАСГ призводить до раннього каспаза-асоційованого розщеплення протеїнів цитоскелетної системи гепатоцитів – цитокератину-8 (СК8) та цитокератину-18 (СК18) [9]. Фрагменти цитокератинів здатні до вивільнення у кровообіг після порушення цілісності плазматичної мембрани гепатоцитів на пізніх стадіях апоптотичного процесу й характеризуються стійкістю до протеолізу, що свідчить про можливість їх визначення в сироватці крові.

Emer Fitzpatrick et al. (2010) показали істотне підвищення рівнів фрагментів СК18 у дітей із морфологічно підтвердженою НАЖХП порівняно зі здоровими [10]. Крім того, Zobair M. Younossi et al. (2008) показали наявність кореляції рівнів фрагментів СК18 у плазмі крові з важкістю захворювання, виявивши значуще зростання СК18 у дітей із НАСГ на відміну від пацієнтів з простим стеатозом [11]. Проте у великому когортному дослідженні Kenneth Cusi et al. (2014) поставили під сумнів діагностичну цінність СК18, а кількість досліджень, що присвячені можливості його застосування для діагностики НАСГ у дітей, взагалі обмежена [12].

Використання комбінованих розрахункових індексів зазвичай забезпечує підвищення діагностичної цінності окремих біомаркерів. Jerome Boursier et al. (2018) запропонували новий розрахунковий індекс, який ґрунтується на комбінації трьох незалежних предикторів розвинутого фіброзу (h₀Ma1-ir, Аст і СК18) – МАСК-3 для діагностики фібротичного НАСГ у дорослих [13]. У багатоцентровому дослідженні за участю 846 пацієнтів із морфологічно підтвердженою НАЖХП індекс МАСК-3 показав відмінні показники діагностичної цінності (чутливість – 90,0 %, специфічність – 94,2 %).

Отже, фрагменти СК18 – перспективні маркери неінвазивного оцінювання ступеня пошкодження

Таблиця 1. Параметри САР для визначення наявності й ступеня стеатозу [14,15]

Показник САР	Ступінь стеатозу	Частка гепатоцитів із жировими включеннями за даними морфометрії
До 232 дБ/м	S ₀	менше ніж 10 %
233–255 дБ/м	S ₁	11–33 %
256–289 дБ/м	S ₂	34–66 %
Понад 290 дБ/м	S ₃	67–100 %

гепатоцитів у разі НАЖХП у дітей, а розрахунковий індекс МАСК-3, що ґрунтується на визначенні СК18, можна використовувати для визначення педіатричних хворих із ризиком несприятливого перебігу захворювання.

Мета роботи

Дослідити відмінності рівнів маркера апоптозу цитокератину-18 (СК18) та комбінованого розрахункового маркера МАСК-3 у дітей із неалкогольним стеатогепатитом, простим стеатозом печінки, надмірною вагою та ожирінням без стеатозу.

Матеріали і методи дослідження

У дослідження «випадок – контроль» залучили 170 пацієнтів віком від 6 до 17 років: 102 (60 %) хлопців, 68 (40 %) дівчат. Середній вік пацієнтів – 12,15 ± 2,51 року. Ознаки стеатозу печінки за даними транз'єнтної еластографії печінки (Fibroscan® 502 touch F60156, Echosense, Франція) мали 90 (53 %) пацієнтів: 37 (41 %) осіб – ознаки НАСГ, 53 (59 %) – простого стеатозу.

За наявністю стеатозу, що визначали за показником контрольованої атенуації ультразвуку (controlled attenuation parameter, САР) (табл. 1), НАСГ (за гендерспецифічними рівнями АЛТ) й наявністю надмірної ваги та ожиріння (відповідно до індексу маси тіла, ІМТ) пацієнтів поділили на 4 групи: перша – 37 хворих із НАСГ (22 %); друга – 53 пацієнти зі стеатогепатозом (31 %); третя – 65 осіб із надмірною вагою та ожирінням без стеатозу печінки (38 %); четверта (контрольна) – 15 дітей із нормальною вагою без стеатозу (9 %). Групи не мали значущих відмінностей за віком обстежених.

Критерій відбору до обстеження – надмірна вага та ожиріння. Критерії виключення з дослідження: інфекційні чи інші запальні хвороби, наявність ознак хронічного вірусного, аутоімунного та токсичного гепатитів.

Рівень СК-18 у сироватці крові визначали шляхом імуноферментного аналізу (ІФА) наборами фірми IDL Biotech AB (Швеція) за допомогою аналізатора «Stat Fax 303 Plus» (США), на якому вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 450 нм. Вміст інсуліну в сироватці крові визначали шляхом ІФА тест-набором фірми «DRG International, Inc.» (ФРН). Для оцінювання інсулінорезистентності використовували індекс HOMA1-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance), який розраховували за формулою: HOMA1-IR = глюкоза натще (ммоль/л) × інсулін натще (мкОд/мл) / 22,5.

Таблиця 2. Характеристика дітей за статтю та віком

Група	Чоловіча стать, n	%	Жіноча стать, n	%	Вік, M ± m	Загалом, n
Група 1	29*	78 %*	8	22 %	12,1 ± 2,55	37
Група 2	35*	66 %*	18	34 %	12,9 ± 2,34	53
Група 3	32	49 %	33	51 %	11,60 ± 2,53	65
Група 4	6	40 %	9	60 %	12,3 ± 2,50	15
Загалом	102	60 %	68	40 %	12,15 ± 2,51	170

*: $p < 0,05$ – значущість відмінностей внутрішньогрупових показників за t-критерієм Стюдента.

Таблиця 3. Характеристика активності гепатоцитолізу та холестазу у групах дослідження (M ± SD)

Показник, одиниці вимірювання	1 група (n = 37)	2 група (n = 53)	3 група (n = 65)	4 група (n = 15)
Загальний білірубін, ммоль/л	10,16 ± 4,56	10,08 ± 0,62	9,59 ± 0,39	10,95 ± 1,09
АЛТ, Од/л	41,30 ± 16,93*.***	17,13 ± 0,59	15,91 ± 0,82	14,68 ± 1,29
АСТ, Од/л	31,20 ± 16,45*.***	16,41 ± 0,86	15,60 ± 0,69	3,18 ± 1,80
АСТ/АЛТ	0,77 ± 0,30*.***	1,64 ± 0,44	1,33 ± 0,55	1,10 ± 0,11
ГГТП, Од/л	27,60 ± 11,20*.***	17,40 ± 0,76	17,32 ± 0,66	14,95 ± 1,03

*: $p < 0,05$ – значущість відмінностей за U-критерієм Манна–Уїтні щодо 4 групи; #: $p < 0,05$ – значущість відмінностей за U-критерієм Манна–Уїтні щодо 2 групи;

***: $p < 0,05$ – значущість відмінностей за U-критерієм Манна–Уїтні щодо 3 групи.

Таблиця 4. Характеристика показників вуглеводного обміну в обстежених, Me [Q1; Q2]

Показник, одиниці вимірювання	1 група (n = 37)	2 група (n = 53)	3 група (n = 65)	4 група (n = 15)
Інсулін, мкОД/мл	27,9 [22,6; 36,4]*.#	24,8 [15,3; 35,3]*.#	19 [13,4; 28,8]*	12,3 [8,5; 14,9]
Глюкоза, ммоль/л	5,0 [4,7; 5,2]*.#	4,8 [4,5; 5,2]	4,6 [4,2; 5,2]	4,6 [4,3; 4,8]
НОМА-IR	6,2 [5,2; 8,5]*.#	5,3 [3,1; 7,7]*	4,0 [2,7; 6,0]*	2,4 [1,6; 2,9]

*: $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей за U-критерієм Манна–Уїтні щодо 4 групи; #: $p < 0,05$ – достовірність відмінностей за U-критерієм Манна–Уїтні щодо 3 групи.

МАСК-3 – результат комбінації тестів (НОМА, АСТ і СК18) – розраховували за допомогою онлайн-калькулятора, що доступний за вебпосиланням: <http://forge.info.univ-angers.fr/~gh/wstat/mack3-calculator.php> [16].

Статистичне опрацювання результатів досліджень виконали методами варіаційної статистики, що реалізовані стандартним пакетом прикладних програм Statistica 6.1 (StatSoft Inc., США, ліцензійний номер AGAR909E415822FA). Для статистичного аналізу даних використовували дескриптивну статистику. Порівняння середніх значень змінних здійснювали за допомогою параметричних методів (t-критерію Стюдента) за умов нормального розподілу ознак. В інших випадках використовували непараметричний метод (U-критерій Манна–Уїтні). Відповідність розподілу нормальному закону перевіряли за допомогою методу Шапіро–Уїлка. Різницю вважали вірогідною, якщо рівень значущості (p) менше ніж 0,05. Кореляційний аналіз виконували за Пірсоном та Спірменом (залежно від того, до яких шкал належали дані). Для оцінювання діагностичної ефективності показників використовували ROC-аналіз із визначенням площі під ROC-кривою (AUC), за результатом визначали якість діагностичної моделі. За допомогою порогового значення розраховували чутливість, специфічність, позитивну та негативну прогностичну цінність. Під час ROC-аналізу показників визначили оптимальні порогові значення для максимальної суми чутливості та специфічності. Усі засоби для вимірювань, використані під час роботи, перевірені за чинним порядком.

До початку дослідження батьки пацієнтів поінформовані про методи та обсяг досліджень, надали згоду на їх проведення.

Результати

Серед дітей із НАЖХП (1 і 2 групи) переважали хлопці, 3 і 4 групи зівставні за ознакою статі пацієнтів (табл. 2). Співвідношення хлопців і дівчат у 1 групі становило 3,5 : 1,0, у 2 групі – 1,9 : 1,0. Групи зівставні за віком обстежених.

Діти з НАСГ відрізнялися від дітей 2, 3 і 4 груп вірогідним підвищенням рівнів гамма-глутамілтрансферази (ГГТП), аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ) та зниженням співвідношення АСТ/АЛТ (табл. 3).

У дітей із НАСГ визначили вірогідне збільшення вмісту інсуліну (у 2,3 раза, $p < 0,05$), глюкози натще та індексу НОМА-IR (у 2,6 раза, $p < 0,05$) щодо показників 4 групи (табл. 4). Пацієнти із НАСГ також вірогідно відрізнялися за рівнем інсуліну, глюкози натще та індексу НОМА-IR від дітей 3 групи.

Діти із НАЖХП (1 і 2 групи) вірогідно відрізнялись від обстежених 3 групи за середніми значеннями показника жорсткості паренхіми печінки (liver stiffness measurement, LSM) ($p < 0,001$) (рис. 1А), а також за показником САР (рис. 1В).

Поділ пацієнтів із НАЖХП за частотою виявлення різних ступенів фіброзу (за шкалою Metavir) та стеатозу печінки наведений на рис. 2А, В.

Діти із НАСГ (1 група) відрізнялися більшою частотою виявлення фібротичних змін печінки різного ступеня (12,9 %) від дітей із простим стеатозом (6 %). Розбіжності за параметром САР зумовлені переважанням найвищого ступеня стеатозу (S3) в 1 групі порівняно з 2 групою.

Вміст СК-18 у сироватці крові хворих 1 групи вірогідно перевищував показники 2, 3 і 4 груп (в 1,6 раза, 2,0 раза, 1,6 раза відповідно, $p < 0,05$) (рис. 3).

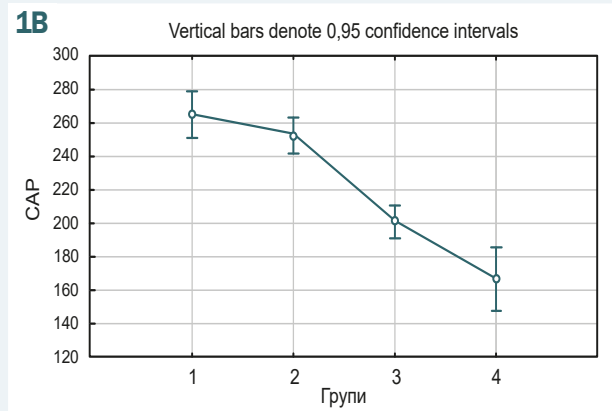
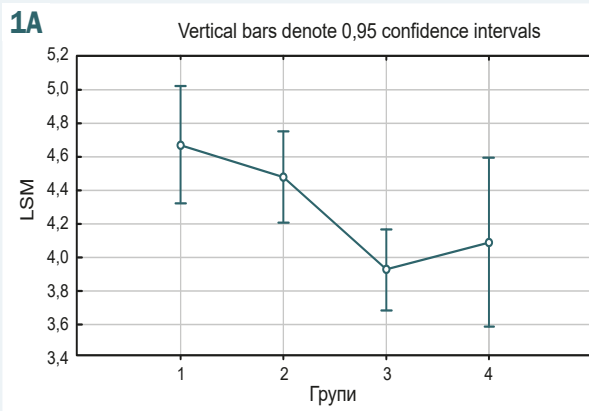


Рис. 1. Середні значення LSM (А) та CAP (В) печінки обстежених за даними транз'єнтноґ еластоґрафії.

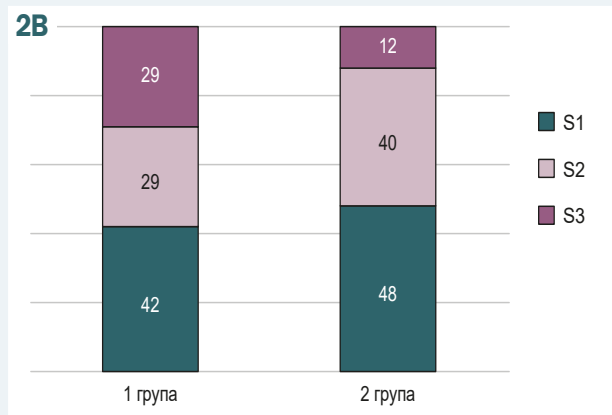
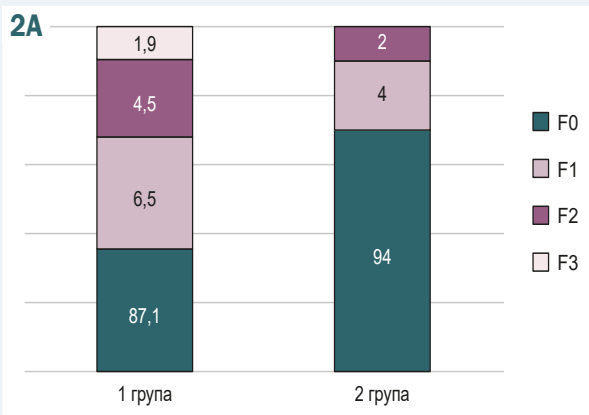


Рис. 2. Частота виявлення різних ступенів фіброзу (А) та стеатозу (В) у дітей із НАЖХП.

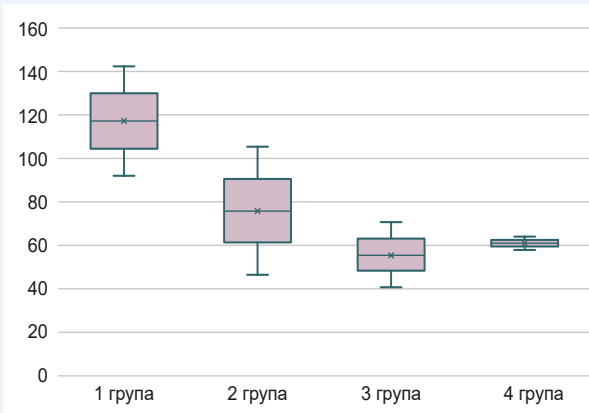


Рис. 3. Порівняння СК18 у групах дослідження (Ме [Q₁; Q₂], min, max).

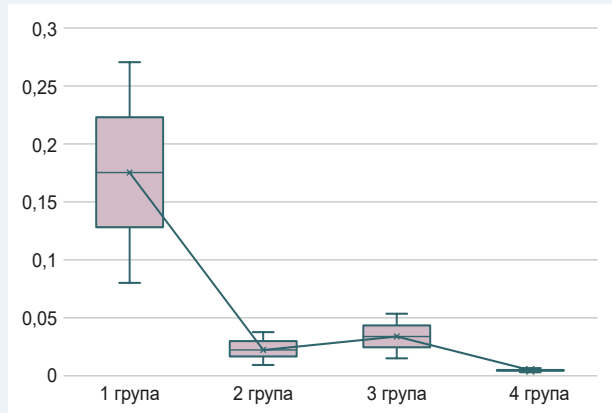


Рис. 4. Порівняння МАКК-3 у групах дослідження (Ме [Q₁; Q₂], min, max).

Таблиця 5. Діагностичні характеристики СК18 при НАСГ

Показники, одиниці вимірювання	СК-18
Порогове значення, U/l	87,4
Чутливість, %	81,8
Специфічність, %	70,0
AUC	0,736
95 % ДІ	0,655–0,921
p (AUC)	<0,05
Позитивне прогностичне значення, %	73,3
Негативне прогностичне значення, %	84,6

Таблиця 6. Діагностична цінність МАКК-3 при НАСГ

Показники, одиниці вимірювання	МАКК-3
Порогове значення, U/l	0,053
Чутливість, %	90,9
Специфічність, %	84,6
AUC	0,958
95 % ДІ	0,788–0,999
p (AUC)	<0,05
Позитивне прогностичне значення, %	83,3
Негативне прогностичне значення, %	91,7

За допомогою ROC-аналізу визначили оптимальне порогове значення СК18 для діагностики НАСГ – 87,4 У/л (табл. 5), отримали такі показники діагностичної цінності: чутливість – 81,8 %, специфічність – 70,0 %, позитивне прогностичне значення – 73,3 %, негативне прогностичне значення – 84,6 %, площа під кривою (AUC) – 0,736 ($p < 0,05$).

У дітей із НАСГ виявили позитивні кореляційні зв'язки між рівнем СК18 і ступенем фіброзу печінки ($r = 0,39$; $p < 0,05$), ступенем стеатозу печінки ($r = 0,78$; $p < 0,001$), рівнем інсуліну ($r = 0,28$; $p < 0,05$).

Представники 1 групи мали вірогідно вищі середні значення індексу МАСК-3 порівняно з 2, 3 і 4 групами ($p < 0,05$) (рис. 4). Оптимальний пороговий рівень МАСК-3 для діагностики НАСГ становив 0,053 із чутливістю 90,9 %, специфічністю 84,6 %, позитивне прогностичне значення – 83,3 %, негативне прогностичне значення – 91,7 %, AUC – 0,958 ($p < 0,05$) (табл. 6). Невелика кількість дітей із фібротичними змінами печінки не дала змоги виявити значущі відмінності МАСК-3 за ступенем фіброзу й визначити порогові значення для діагностики розвинутого фіброзу.

Обговорення

За результатами дослідження, отримали доволі високі порівняно з даними транзйентної еластографії показники діагностичної точності СК18 для діагностики НАСГ у дітей: чутливість порогового значення СК18 ($\geq 87,4$ У/л) становила 81,8 %, специфічність – 70,0 %, AUC – 0,736 ($p < 0,05$). Отже, 81,8 % пацієнтів із припущенням про наявність НАСГ можуть бути ідентифіковані за допомогою СК18 й уникнути біопсії печінки, 30 % хворих можуть потребувати додаткових досліджень, зокрема морфологічного дослідження для уточнення діагнозу.

Мультицентрове валідаційне дослідження NASH CRN дорослих пацієнтів із морфологічно підтвердженою НАЖХП показало, що рівень СК18 у плазмі крові – незалежний предиктор НАСГ (AUC 0,83; 95 % ДІ: 0,75–0,91) [9]. Giovanni Musso et al. (2011) здійснили метааналіз 32 опублікованих досліджень, показали чутливість 78 % (0,64–0,92), специфічність 87 % (0,77–0,98), AUC 0,82 (0,78–0,88) СК18 для діагностики НАСГ у дорослих [17]. У метааналізі Lei He et al. (2017) визначено, що СК18 (М30) має помірну точність для диференційної діагностики НАСГ і НАЖХП: AUC 0,82 (95 % СІ, 0,79–0,85), чутливість 0,75 (95 % СІ, 0,69–0,81), специфічність 0,77 (95 % СІ, 0,68–0,84) [18].

Показники чутливості та специфічності СК18, що отримали під час дослідження, приблизно збігаються з даними метааналізу Lei He et al. Певні відмінності можуть бути пов'язані з тим, що верифікація НАЖХП у нашому дослідженні здійснена шляхом транзйентної еластографії, а не морфологічного дослідження печінки. Низький рівень специфічності тесту зумовлює необхідність його вдосконалення, яке можна здійснити шляхом комбінації СК18 з іншими маркерами або візуалізаційними методами [19].

Додаткова перевага СК18 перед іншими біомаркерами – його здатність корелювати з активністю гепатоцелюлярного апоптозу, тобто чітко показувати

ступінь пошкодження гепатоцитів [18]. Встановлено, що динамічні зміни рівня сироваткових фрагментів СК18 пов'язані з односпрямованими змінами активності запалення та ступеня фіброзу печінкової тканини, їх можна використовувати для моніторингу перебігу НАСГ і діагностики розвинутого фіброзу в дорослих і дітей [19,20]. Протягом дослідження виявили позитивний кореляційний зв'язок рівня СК18 зі ступенем фіброзу та стеатозу печінки, а також параметрами метаболічного профілю (рівнем інсуліну).

Поєднання СК18 з іншими маркерами або клінічними показниками дає змогу істотно підвищити діагностичну точність індексів (табл. 7). Панель апоптозу (запропонована Tarek I. Abu-Rajab Tamimi et al.), прогностична модель НАСГ (Zobair M. Younossi et al.) і діагностична панель НАЖХП демонструють вищі показники чутливості та специфічності при відмінних значеннях AUC порівняно з ізольованим визначенням СК18 [11,21,22]. Ці шкали залишаються невалідованими в дітей.

Комбінований розрахунковий індекс МАСК-3, який поєднує СК18 з маркерами, що асоційовані з ушкодженням печінки (АСТ) та інсулінорезистентністю (НОМА1-IR), показує важкість ураження печінки й має відмінну діагностичну точність (93,3 %) для виявлення фібротичного типу перебігу НАСГ [13]. За даними нашого дослідження, діти з НАСГ вірогідно відрізнялися від пацієнтів із простим стеатозом за рівнями МАСК-3. Показник діагностичної точності МАСК-3 для НАСГ (AUC 0,958; $p < 0,05$) суттєво перевищив діагностичну точність показника СК18 (AUC 0,736; $p < 0,05$). На жаль, обмежена кількість пацієнтів із фіброзом печінки не дала змоги визначити порогові значення МАСК-3 для розрізнення ступенів фіброзу.

Враховуючи значно вищі показники діагностичної точності транзйентної еластографії печінки у виявленні фіброзу будь-якого ступеня, у тому числі розвинутого, у разі НАСГ порівняно з іншими методиками візуалізації та неінвазивними маркерами, поєднання МАСК-3 та транзйентної еластографії, на нашу думку, доцільне для поліпшення ефективності селекції педіатричних хворих щодо виконання біопсії печінки й активного терапевтичного втручання (табл. 8).

Алгоритм діагностики НАСГ із використанням СК18 і МАСК-3 наведений на рис. 5.

Дослідження, що присвячені індексу МАСК-3 у педіатричній популяції в доступній фаховій літературі відсутні, тому ця робота є першою спробою удосконалення діагностичного алгоритму шляхом визначення ефективності застосування цього показника для діагностики форм НАЖХП, що здатні до швидкого прогресування, й визначення осіб, які потребують морфологічного дослідження та інтенсифікації терапії.

Отже, СК18 – надійний скринінговий маркер, що дає змогу відрізнити пацієнтів із НАСГ і хворих із НАЖХП. Перевага комбінованого розрахункового індексу МАСК-3 полягає в підвищенні діагностичної точності й реалізації можливості виявлення форм НАЖХП, що здатні до швидкого прогресування, оскільки саме активний НАСГ зумовлює прогресування фіброзу під час НАЖХП [23]. Поєднання МАСК-3 з транзйентною еластографією в педіатричній популяції

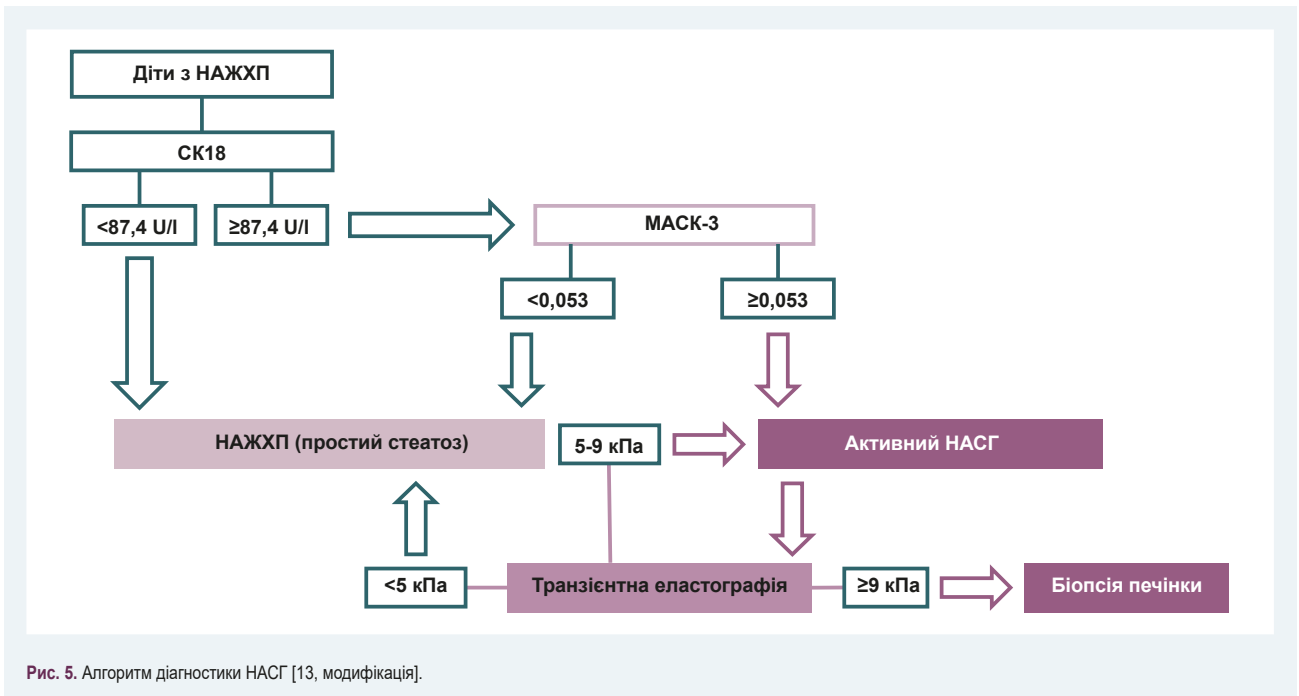


Рис. 5. Алгоритм діагностики НАСГ [13, модифікація].

Таблиця 7. Характеристика комбінованих СК18-асоційованих шкал діагностики НАСГ

Діагностична панель	Досліджувані біомаркери	Чутливість, %	Специфічність, %	AUC	Зовнішня валідація	Валідація в педіатричній популяції	Посилання
Панель апоптозу	СК18 розчинні фрагменти Fas, Fas-ліганди	88	89	0,79–0,93	+	–	[22]
НАСГ прогностична модель	СК18-М30, СК18-М65, адипонектин, резистин	95,5	70,2	0,91	+	–	[11]
НАЖХП діагностична панель	Цукровий діабет 2 типу, стать, ІМТ, тригліцериди, СК18-М30, СК18-М65-М30	91	47	0,81	–	–	[23]

Таблиця 8. Порівняльна характеристика різних неінвазивних тестів у діагностиці фіброзу при НАЖХП [4]

Маркер	Інтерпретація	Діагностична точність	Вартість
PNFS	PNFS ≥26 % зі специфічністю 92 % прогнозує розвинутий фіброз PNFS ≤8 % з чутливістю 97 % виключає розвинутий фіброз	AUC 0,74 для розвинутого фіброзу (F ≥2)	+
Гіалуронова кислота (hyaluronic acid, HA)	HA ≥1200 нг/мл: ймовірність фіброзу 7 % (95 % CI: 1–14 %) HA ≥2100 нг/мл ймовірність F2–F4: 89 % (95 % CI: 75–100 %)	AUC 0,95	++
СК18 і перцентиль обводу талії	Значення 35 з чутливістю 97 % виключає фіброз Значення 82 зі специфічністю 88% прогнозує розвинутий фіброз	AUC 0,84 для будь-якого фіброзу	++
ELF	ELF ≥9,28 ймовірності будь-якого фіброзу ELF ≥10,18 ймовірності значущого фіброзу ELF ≥10,51 ймовірності розвинутого фіброзу	AUC 0,92 для фіброзу будь-якого ступеня AUC 0,98 для значущого фіброзу AUC 0,99 для розвинутого фіброзу	++
Транзйентна еластографія	5–7 кПа: F1–4 7–9 кПа: F2–4 9 кПа: F3–4	AUC 0,977 для фіброзу будь-якого ступеня AUC 0,992 для значущого фіброзу AUC 1,000 для розвинутого фіброзу	+++
Магнітно-резонансна еластографія	Значення жорсткості печінки 2,71 кПа має чутливість 88 % і специфічність 85 % при фіброзі ≥F2	AUC 0,92 для значущого фіброзу	+++
Акустична імпульсна еластографія (ARFI)	Порогове значення 2,0 м/с для фіброзу ≥F3	100 % чутливість, 39 % специфічність для розвинутого фіброзу	+++

+: низька; ++: середня; +++: висока

допоможе раціоналізувати стратифікацію пацієнтів із НАСГ для виконання морфологічного дослідження печінки й мінімізувати ризики для хворих.

Висновки

1. Визначення вмісту маркера апоптотичної загибелі гепатоцитів (цитокератину 18) у сироватці крові дає можливість підвищити ефективність ран-

ньої діагностики НАСГ у дітей. Доступність та якісний профіль діагностичної точності (чутливість – 81,8 %, специфічність – 70,0 %) цього маркера дають змогу рекомендувати його використання на первинній і вторинній ланці системи охорони здоров'я.

2. Комбінація маркера апоптозу СК18 із маркерами ушкодження гепатоцитів (АСТ) та інсулінорезистентності (НОМА-ІR) у розрахунковому індексі МАСК-3 завдяки поліпшенню показників діагностичної точності

(чутливість – 90,9 %, специфічність – 84,6 %) розширює можливості діагностики активного НАСГ у дітей.

3. Поєднання визначення СК18, розрахункового індексу МАСК-3 із виконанням транзйентної еластографії дає змогу створити алгоритм діагностики НАСГ у пацієнтів із НАЖХП та поліпшити ефективність ранньої діагностики НАСГ.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні можливостей застосування СК18-асоційованих маркерів для диференційної діагностики різних ступенів фіброзу печінки й розвинутого фіброзу при НАЖХП.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України» «Вивчити провідні фактори впливу на перебіг неалкогольного стеатозу печінки у дітей, розробити критерії прогнозування несприятливого перебігу та диференційований алгоритм лікувальних заходів», № держреєстрації 0114U005583.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflict of interests: authors have no conflict of interests to declare.

Надійшла до редакції / Received: 02.09.2020

Після доопрацювання / Revised: 05.10.2020

Прийнято до друку / Accepted: 07.10.2020

Відомості про авторів:

Степанов Ю. М., д-р мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро; головний спеціаліст НАМН України з гастроентерології та дієтології, заслужений лікар України.

ORCID ID: [0000-0002-6721-2468](https://orcid.org/0000-0002-6721-2468)

Завгородня Н. Ю., канд. мед. наук, зав. відділу дитячої гастроентерології, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.

ORCID ID: [0000-0001-5821-1351](https://orcid.org/0000-0001-5821-1351)

Завгородня О. Ю., канд. мед. наук, старший науковий співробітник відділу дитячої гастроентерології, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.

ORCID ID: [0000-0002-1758-3981](https://orcid.org/0000-0002-1758-3981)

Ягмур В. Б., канд. мед. наук, старший науковий співробітник відділу захворювань печінки та підшлункової залози, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.

ORCID ID: [0000-0002-1738-4624](https://orcid.org/0000-0002-1738-4624)

Татарчук О. М., канд. біол. наук, старший науковий співробітник науково-дослідного сектора, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.

ORCID ID: [0000-0002-0672-972X](https://orcid.org/0000-0002-0672-972X)

Петішко О. П., науковий співробітник відділу науково-організаційної, методичної роботи та інформаційних технологій, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро.

ORCID ID: [0000-0002-4559-4055](https://orcid.org/0000-0002-4559-4055)

Information about authors:

Stepanov Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor, Director of the SI "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro; Chief Specialist of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine in Gastroenterology and Dietetics, Honored Doctor of Ukraine. Zavorodnia N. Yu., MD, PhD, Head of the Pediatric Gastroenterology Department, SI "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro. Zavorodnia O. Yu., MD, PhD, Senior Researcher of the Pediatric Gastroenterology Department, SI "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.

Yahmur V. B., MD, PhD, Senior Researcher of Liver and Pancreatic Diseases Department, SI "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.

Tatarchuk O. M., PhD in Biology, Senior Researcher of the Department of Scientific Researches, SI "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.

Petishko O. P., Researcher of the Department of Scientific-Organizational, Methodological Work and Information Technologies, SI "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.

Сведения об авторах:

Степанов Ю. М., д-р мед. наук, профессор, директор ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро; главный специалист НАМН Украины по гастроэнтерологии и диетологии, заслуженный врач Украины.

Завгородняя Н. Ю., канд. мед. наук, зав. отделом детской гастроэнтерологии, ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро.

Завгородняя О. Ю., канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела детской гастроэнтерологии, ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро.

Ягмур В. Б., канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела заболеваний печени и поджелудочной железы, ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро.

Татарчук О. М., канд. биол. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского сектора, ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро.

Петішко О. П., научный сотрудник отдела научно-организационной, методической работы и информационных технологий, ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро.

Список літератури

- [1] European paediatric non-alcoholic fatty liver disease registry (EU-PNAFLD): Design and rationale / J. P. Mann, A. Vreugdenhil, P. Socha et al. *Contemporary clinical trials*. 2018. Vol. 75, 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2018.11.003>
- [2] Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Hepatic and Extrahepatic Complications / P. Selvakumar, M. N. Kabbany, V. Nobili, N. Alkhouri. *Pediatric clinics of North America*. 2017. Vol. 64, Iss. 3. P. 659-675. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.01.008>
- [3] Ko J. S. New Perspectives in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Epidemiology, Genetics, Diagnosis, and Natural History. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*. 2019. Vol. 22, Iss. 6. P. 501-510. <https://doi.org/10.5223/pghn.2019.22.6.501>
- [4] The search for noninvasive methods to identify liver fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease / C. Mandelia, M. N. Kabbany, P. K. Conjeevaram Selvakumar, N. Alkhouri. *Biomarkers in medicine*. 2018. Vol. 12, Iss. 3. P. 265-273. <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0038>
- [5] Goyal N. P., Schwimmer, J. B. The Progression and Natural History of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinics in liver disease*. 2016. Vol. 20, Iss. 2. P. 325-338. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.003>
- [6] NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN) / M. B. Vos, S. H. Abrams, S. E. Barlow et al. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2017. Vol. 64, Iss. 2. P. 319-334. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001482>
- [7] NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs / V. Nobili, A. Alisi, L. Valenti et al. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 2019. Vol. 16, Iss. 9. P. 517-530. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0169-z>
- [8] Drajer L., Benninga M., Koot B. Pediatric NAFLD: an overview and recent developments in diagnostics and treatment. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2019. Vol. 13, Iss. 5. P. 447-461. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1595589>
- [9] Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study / A. E. Feldstein, A. Wieckowska, A. R. Lopez et al. *Hepatology*. 2009. Vol. 50, Iss. 4. P. 1072-1078. <https://doi.org/10.1002/hep.23050>
- [10] Serum levels of CK18 M30 and leptin are useful predictors of steatohepatitis and fibrosis in paediatric NAFLD / E. Fitzpatrick, R. R. Mity, A. Quaglia et al. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010. Vol. 51, Iss. 4. P. 500-506. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181e376be>
- [11] A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH) / Z. M. Younossi, M. Jarrar, C. Nugent et al.

- Obesity surgery*. 2008. Vol. 18, Iss. 11. P. 1430-1437. <https://doi.org/10.1007/s11695-008-9506-y>
- [12] Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease / K. Cusi, Z. Chang, S. Harrison et al. *Journal of hepatology*. 2014. Vol. 60, Iss. 1. P. 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.042>
- [13] Screening for therapeutic trials and treatment indication in clinical practice: MACK-3, a new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH / J. Boursier, R. Anty, L. Vonghia et al. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2018. Vol. 47, Iss. 10. P. 1387-1396. <https://doi.org/10.1111/apt.14621>
- [14] Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography / V. de Lédinghen, J. Vergniol, J. Foucher et al. *Liver international*. 2012. Vol. 32, Iss. 6. P. 911-918. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02820.x>
- [15] Comparison of Controlled Attenuation Parameter and Liver Biopsy to Assess Hepatic Steatosis in Pediatric Patients / N. K. Desai, S. Hamey, R. Raza et al. *The Journal of pediatrics*. 2016. Vol. 173. P. 160-164.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.03.021>
- [16] MACK-3 (combination of hoMa, Ast and CK18): A promising novel biomarker for fibrotic non-alcoholic steatohepatitis / K. H. Chuah, W. Wan Yusoff, P. Sthaneshwar et al. *Liver international*. 2019. Vol. 39, Iss. 7. P. 1315-1324. <https://doi.org/10.1111/liv.14084>
- [17] Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity / G. Musso, R. Gambino, M. Cassader, G. Pagano. *Annals of medicine*. 2011. Vol. 43, Iss. 8. P. 617-649. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.518623>
- [18] Diagnostic Value of CK-18, FGF-21, and Related Biomarker Panel in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis / L. He, L. Deng, Q. Zhang et al. *BioMed research international*. 2017. Vol. 2017. P. 9729107. <https://doi.org/10.1155/2017/9729107>
- [19] Serum cytokeratin-18 and its relation to liver fibrosis and steatosis diagnosed by FibroScan and controlled attenuation parameter in nonalcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus patients / S. K. Darweesh, R. A. AbdElAziz, D. S. Abd-ElFatah et al. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2019. Vol. 31, Iss. 5. P. 633-641. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001385>
- [20] Effect of diet-induced weight loss on cytokeratin-18 levels in overweight and obese patients with liver fibrosis / M. Safarian, S. Mohammadpour, M. Shafiee et al. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2019. Vol. 13, Iss. 2. P. 989-994. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.005>
- [21] An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis / T. I. Tamimi, H. M. Elgouhari, N. Alkhouri et al. *Journal of hepatology*. 2011. Vol. 54, Iss. 6. P. 1224-1229. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.023>
- [22] A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis / Z. M. Younossi, S. Page, N. Rafiq et al. *Obesity surgery*. 2011. Vol. 21, Iss. 4. P. 431-439. <https://doi.org/10.1007/s11695-010-0204-1>
- [23] Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease / P. Angulo, D. E. Kleiner, S. Dam-Larsen et al. *Gastroenterology*. 2015. Vol. 149, Iss. 2. P. 389-397.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>
- [7] Nobili, V., Alisi, A., Valenti, L., Miele, L., Feldstein, A. E., & Alkhouri, N. (2019). NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(9), 517-530. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0169-z>
- [8] Draijer, L., Benninga, M., & Koot, B. (2019). Pediatric NAFLD: an overview and recent developments in diagnostics and treatment. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 13(5), 447-461. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1595589>
- [9] Feldstein, A. E., Wieckowska, A., Lopez, A. R., Liu, Y. C., Zein, N. N., & McCullough, A. J. (2009). Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*, 50(4), 1072-1078. <https://doi.org/10.1002/hep.23050>
- [10] Fitzpatrick, E., Mitry, R. R., Quaglia, A., Hussain, M. J., DeBruyne, R., & Dhawan, A. (2010). Serum levels of CK18 M30 and leptin are useful predictors of steatohepatitis and fibrosis in paediatric NAFLD. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 51(4), 500-506. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181e376be>
- [11] Younossi, Z. M., Jarrar, M., Nugent, C., Randhawa, M., Afendy, M., Stepanova, M., Rafiq, N., Goodman, Z., Chandhoke, V., & Baranova, A. (2008). A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obesity surgery*, 18(11), 1430-1437. <https://doi.org/10.1007/s11695-008-9506-y>
- [12] Cusi, K., Chang, Z., Harrison, S., Lomonaco, R., Bril, F., Orsak, B., Ortiz-Lopez, C., Hecht, J., Feldstein, A. E., Webb, A., Louden, C., Goros, M., & Tio, F. (2014). Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 60(1), 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.042>
- [13] Boursier, J., Anty, R., Vonghia, L., Moal, V., Vanwolleghem, T., Canivet, C. M., ... Francque, S. (2018). Screening for therapeutic trials and treatment indication in clinical practice: MACK-3, a new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 47(10), 1387-1396. <https://doi.org/10.1111/apt.14621>
- [14] de Lédinghen, V., Vergniol, J., Foucher, J., Merrouche, W., & le Bail, B. (2012). Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver international*, 32(6), 911-918. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02820.x>
- [15] Desai, N. K., Hamey, S., Raza, R., Al-Ibraheemi, A., Shillingford, N., Mitchell, P. D., & Jonas, M. M. (2016). Comparison of Controlled Attenuation Parameter and Liver Biopsy to Assess Hepatic Steatosis in Pediatric Patients. *The Journal of pediatrics*, 173, 160-164.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.03.021>
- [16] Chuah, K. H., Wan Yusoff, W., Sthaneshwar, P., Nik Mustapha, N. R., Mahadeva, S., & Chan, W. K. (2019). MACK-3 (combination of hoMa, Ast and CK18): A promising novel biomarker for fibrotic non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international*, 39(7), 1315-1324. <https://doi.org/10.1111/liv.14084>
- [17] Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., & Pagano, G. (2011). Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of medicine*, 43(8), 617-649. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.518623>
- [18] He, L., Deng, L., Zhang, Q., Guo, J., Zhou, J., Song, W., & Yuan, F. (2017). Diagnostic Value of CK-18, FGF-21, and Related Biomarker Panel in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed research international*, 2017, 9729107. <https://doi.org/10.1155/2017/9729107>
- [19] Darweesh, S. K., AbdElAziz, R. A., Abd-ElFatah, D. S., AbdElazim, N. A., Fathi, S. A., Attia, D., & AbdAllah, M. (2019). Serum cytokeratin-18 and its relation to liver fibrosis and steatosis diagnosed by FibroScan and controlled attenuation parameter in nonalcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus patients. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 31(5), 633-641. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001385>
- [20] Safarian, M., Mohammadpour, S., Shafiee, M., Ganji, A., Soleimani, A., Nematy, M., & Bahari, A. (2019). Effect of diet-induced weight loss on cytokeratin-18 levels in overweight and obese patients with liver fibrosis. *Diabetes & metabolic syndrome*, 13(2), 989-994. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.005>
- [21] Tamimi, T. I., Elgouhari, H. M., Alkhouri, N., Yerian, L. M., Berk, M. P., Lopez, R., Schauer, P. R., Zein, N. N., & Feldstein, A. E. (2011). An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *Journal of hepatology*, 54(6), 1224-1229. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.023>
- [22] Younossi, Z. M., Page, S., Rafiq, N., Biredinc, A., Stepanova, M., Hosain, N., Afendy, A., Younoszai, Z., Goodman, Z., & Baranova, A. (2011). A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis. *Obesity surgery*, 21(4), 431-439. <https://doi.org/10.1007/s11695-010-0204-1>
- [23] Angulo, P., Kleiner, D. E., Dam-Larsen, S., Adams, L. A., Bjornson, E. S., Charatcharoenwitthaya, P., Mills, P. R., Keach, J. C., Lafferty, H. D., Stahler, A., Hafidaddottir, S., & Bendtsen, F. (2015). Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 149(2), 389-397.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>