

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ

*Corelații între ficatul gras non alcoolic (NAFLD) și factorii de risc  
cardiovascular in populația pediatrică*  
**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**  
**PROF. UNIV. DR. GHERGHINA IOAN**

**Student-doctorand:**  
**LĂDARU (CĂS. BĂLĂNESCU) ANCA**

**ANUL**  
**2018**

## CUPRINS

**Introducere si definiții.....pagina 8**

### **I. Partea generală**

1. Noțiuni de epidemiologie a steatozei hepatice non-alcoolice (NAFLD).....pagina 15
2. Etiopatogeneza NAFLD..... pagina 22
3. Tablou clinic in NAFLD.....pagina 29
4. Criterii de diagnostic ai steatozei hepatice non-alcoolice in populația pediatrică.....pagina 30
5. Diagnostic diferențial.....pagina 38
6. Tratament..... pagina 40
7. Afectarea extrahepatică in cadrul steatozei hepatice non-alcoolice..... pagina 45
  - 7.1.Riscul cardiovascular..... pagina 45
  - 7.2. Diabetul zaharat de tip 2..... pagina 47
  - 7.3.Boala cronica renală .....pagina 48
  - 7.4. Apneea obstructivă de somn..... pagina 49
  - 7.5.Hipovitaminoza D<sub>3</sub> si osteoporoza..... pagina 49
  - 7.6.Endocrinopatiile ..... pagina 50
  - 7.7. Neoplaziile extrahepatice – cancerul colorectal..... pagina 50
  - 7.8.Psoriazisul..... pagina 51
  - 7.9.Tulburari ale metabolismului fierului..... pagina 51
  - 7.10. Calitatea vieții..... pagina 52

**II. Contribuții personale.....pagina 53**

8. Ipoteza de lucru si obiectivele generale.....pagina 54
9. Metodologia generală a cercetării..... pagina 55
10. Studiul 1 - Biomarkeri proteomici candidați pentru ficatul gras non-alcoolic (steatoza si steatohepatita non-alcoolică) descoperiți prin spectrometrie de masă: o sinteză sistematică.....pagina 65
  - 10.1. Introducere.....pagina 65
  - 10.2. Materiale și metode ale sintezei sistematice..... pagina 66

10.3.	Rezultate obținute din sinteza sistematică a biomarkerilor identificați din literatură.....	pagina 69
10.3.1.	Selectarea grupului control.....	pagina 69
10.3.2.	Tipurile de tehnică proteomică utilizate.....	pagina 84
10.3.3.	Tipul de probă biologică în care au fost identificați biomarkerii.....	pagina 85
10.3.4.	Biomarkerii identificați.....	pagina 85
10.3.5.	Validarea biomarkerilor identificați.....	pagina 86
10.3.6.	Calitatea studiilor incluse în sinteza sistematică.....	pagina 86
10.4.	Discuții.....	pagina 87
10.5.	Limitările studiului.....	pagina 94
10.6.	Concluzii.....	pagina 94
11.	Studiul 2 - Profilul lipidic al pacienților supraponderali pediatrici (ce prezintă sau nu steatoză hepatică non-alcoolică) în relație cu criteriile IDF pentru definirea sindromului metabolic.....	pagina 96
11.1.	Introducere.....	pagina 96
11.2.	Materiale și metode.....	pagina 98
11.3.	Rezultate.....	pagina 99
11.4.	Discuții.....	pagina 109
11.5.	Limitele studiului.....	pagina 113
11.6.	Concluzii și direcții de perspectivă.....	pagina 114
11.7.	Prezentare de caz.....	pagina 114
12.	Studiul 3 - Evaluarea unui panel de biomarkeri candidat la pacienții pediatrici cu obezitate ce asociază sau nu NAFLD.....	pagina 119
12.1.	Introducere.....	pagina 119
12.2.	Materiale și metode.....	pagina 119
12.3.	Rezultate.....	pagina 124
12.4.	Discuții.....	pagina 134
12.5.	Limitele studiului.....	pagina 137
12.6.	Concluzii.....	pagina 138
12.7.	Prezentare de caz.....	pagina 139
	<b>Concluzii și contribuții personale.....</b>	<b>pagina 143</b>
	<b>Bibliografie.....</b>	<b>pagina 145</b>

## INTRODUCERE ȘI DEFINIȚII

Lucrarea de față are ca obiectiv principal identificarea unor caracteristici clinice și paraclinice la pacientul pediatric cu steatoză hepatică non-alcoolică (NAFLD – Non-alcoholic Fatty Liver Disease) ce se asociază cu factorii de risc cardiovasculari clasici (hipertensiunea, dislipidemia, obezitatea, expunerea la fum de țigară, istoricul familial pozitiv). Totodată, în plan secund am propus estimarea prevalenței NAFLD în cadrul populației pediatrice supraponderale/obeze, identificarea în literatura de specialitate a biomarkerilor proteomici specifici pacienților cu NAFLD prin realizarea unei sinteze sistematice și ulterior determinarea serică a biomarkerilor proteomici candidați selecționați prin sinteza sistematică, precum și identificarea unui/unor markeri surogat pentru evaluarea și stratificarea riscului cardiovascular în populația studiată.

Necesitatea obținerii unor răspunsuri la problemele ridicate în formularea obiectivelor vine pe fondul confirmării epidemiologice a unei pandemii de obezitate infantilă, care vine cu repercursiunile ei metabolice, cardiovasculare, psihosociale [1,2].

Un lucru cert este că în cadrul populației supraponderale sau obeze prevalența steatozei hepatice non-alcoolice este ridicată chiar și în populația pediatrică [1]. NAFLD acoperă întregul spectru de la simplă steatoză hepatică la NASH (steatohepatita non alcoolică) putând evolua cu fibroză avansată către ciroza hepatică și carcinom hepatocelular [1, 2]. NAFLD ca spectru de boală a devenit o problemă de sănătate publică majoră fiind în țările industrializate cea mai frecventă cauza de boala cronică hepatică la copil ce necesită transplant hepatic [1, 2], observată o dată cu creșterea prevalenței obezității în ultimele 3 decade și asociată cu creșterea rezistenței la insulină. De aici rezultă necesitatea unei atenții sporite asupra obezității infantile cu obligativitatea instituirii screeningului complicațiilor de orice natură asociate precum și a evaluării hepatice cât și a complicațiilor extrahepatice în relație cu NAFLD la un pacient obez cu risc metabolic. Aceste complicații asociate binomului obezitate - NAFLD contribuie la scăderea speranței de viață deoarece mortalitatea în cadrul acestor boli vine prin apariția evenimentelor cardiovasculare ca și complicații conexe [1, 2].

Un alt aspect important ce trebuie menționat atunci când discutăm despre NAFLD este că există și în momentul actual probleme de diagnostic deoarece standardul de aur în diagnostic este

unul imperfect prin invazivitatea lui (biopsia hepatică) [1, 2] și, suplimentar, există probleme de tratament. Scopul final al tuturor cercetărilor în derulare cu privire la acest subiect se rezumă pe de o parte la a găsi o metodă de diagnostic suficient de specifică și sensibilă, un biomarker sau o combinație de biomarkeri și metode imagistice neinvazive care să pună diagnosticul de acuratețe mai ales în cazul acelor pacienți care prezintă boala evolutivă, semnificativă din punct de vedere clinic deoarece principala problemă în cazul NAFLD este aceea a distincției între acei pacienți care au evoluție staționară, benignă și cei care vor evolua către stadiile clinic importante (NASH, fibroză, ciroza hepatică, carcinom hepato-celular). Pe de altă parte se fac eforturi pentru a identifica țintele terapeutice în cadrul acestei boli cu determinism multifactorial deoarece până în momentul de față nici un alt parametru în afară de scăderea semnificativă în greutate (>10% din greutate) și modificarea stilului de viață nu a putut oferi rezultate semnificative în ceea ce privește retrocedarea inflamației și fibrozei hepatice.

## **1. NOȚIUNI DE EPIDEMIOLOGIE A STEATOZEI HEPATICE NON-ALCOOLICE (NAFLD)**

Prevalența exactă a steatozei hepatice non-alcoolice (NAFLD) nu este cunoscută deoarece încă nu există metode de diagnostic noninvazive cât mai specifice. Aceasta problemă este una și mai pregnantă în cadrul populației pediatrice deoarece conștientizarea faptului că această patologie poate afecta și copilul, nu doar adolescentul și tânărul adult, a câștigat teren abia din ultima decadă. Metodele imagistice sunt cele mai folosite pentru evaluarea acestei patologii însă le lipsește sensibilitatea pentru modificările steatotice ușoare și, un aspect foarte important, nu pot distinge dintre steatohepatită și steatoză simplă [8]. **Prevalența NAFLD în cadrul populației generale** (fără factori de risc asociați) variază în studii între **9% și 36.9%** [9,10]. Mai mult decât atât, prevalența steatohepatitei non-alcoolice (NASH) în populația generală (neexpusa unor anumiți factori de risc) nu poate fi evaluată având în vedere că este necesară biopsia pentru certitudinea diagnosticului iar biopsia hepatică nu poate fi acceptată ca metodă de screening din cauza invazivității sale. Astfel, raportările din literatură cu privire la prevalența steatozei hepatice non-alcoolice variază în funcție de modul de screening al acestei patologii (nivelul ALT, screening ultrasonografic, cuantificarea conținutului de grăsime hepatică prin CT sau MRI ori MRS sau diagnostic de certitudine prin puncție biopsie hepatică). **Prevalența NAFLD** menționată de ghidul **NASPGHAN in 2017** este de **0.7%** in populația pediatrică între **2 și 4 ani**

(diagnosticat de certitudine la autopsie) și între **29-38%** în toate grupele de vârstă ale populației pediatrice. Un amănunt îngrijorător subliniat de către NASPGHAN este acela că în ultima decadă **prevalența NAFLD a crescut de 2.7 ori** față de finalul anilor '80, creștere care a fost mai rapidă decât aceea a obezității în același interval de timp [2].

## 2. ETIOPATOGENEZA NAFLD

În ultimii ani, în literatură de specialitate, s-a observat o schimbare de paradigmă în ceea ce privește patogeneza NAFLD. Dacă inițial în prima decadă a anilor 2000 era acceptată ideea că NAFLD este rezultatul a doi factori care acționează cumva înlănțuit („**two hit pathogenesis**”), ulterior datele obținute din studii indicau tot mai mult faptul că ar putea fi cel puțin trei factori implicați în patogeneza steatozei hepatice non-alcoolice, pentru că în momentul de față să fie unanim acceptat faptul că NAFLD este o **boală multifactorială** („**multiple-hit pathogenesis**”).

În patogeneza explicată de teoria unei „duble lovituri” (two hit theory) se stipula că sunt necesari factorii care determină steatoza hepatică (prima lovitură) dar pentru progresia către NASH este necesară și o „a doua lovitură” și anume necesitatea coexistenței steatozei și stresului oxidativ. Steatoza de orice etiologie, implicit și cea asociată obezității, implică dezvoltarea necro-inflamației și fibrozei hepatice, în timp ce peroxidarea lipidelor reprezintă o sursă sigură de specii reactive de oxigen, mai ales în cazul unui individ care „pune la dispoziție” și o cantitate importantă de acizi grași liberi circulanți, pregătind astfel terenul pentru că acești doi factori însumați să contribuie la dezvoltarea steatohepatitei non-alcoolice [34].

Necesitatea modificării de teorie a patogenezei de la cea bazată pe cei doi factori declanșatori la una multifactorială explicată de o înlănțuire de evenimente și factorii care converg către progresia bolii, a venit din incapacitatea primei teorii de a explica de ce doar o mică parte dintre pacienții cu NAFLD progresează către stadii de boală clinic semnificative în timp ce alții rămân asimptomatici. Era evident faptul că mai era și „altceva” implicat. Astfel s-a stipulat că probabil NAFLD este rezultatul combinației dintre stilul de viață și factorii de mediu, grefată pe un fond genetic particular și susceptibil al individului afectat [35]. Acum știm că spectrul de boală al steatozei hepatice non-alcoolice se dezvoltă și progresează atunci când sunt întruniți mai mulți factori, *primum movens* fiind într-adevăr îndeplinirea condițiilor pentru steatogeneza hepatică (dieta vestică, hipercalorică - bogată în lipide, carbohidrați și alimente procesate pe fondul unui stil de viață sedentar) la care se asociază consecințele rezistenței la insulină, pe

fondul unui teren genetic predispus, împreună cu factori epigenetici, stresul oxidativ, dismicrobismul intestinal și dezechilibre ale axei ficat-intestin și diverse carențe nutriționale (deficit de vitamina D).

Mai mult, într-o revizie a literaturii recent publicată de către Wesolowski S.R et al în 2017 [36], se emite ipoteza în care expunerea fetală la micromediul uterin poate prezice dezvoltarea NAFLD cu predispoziție pentru NASH la produsul de concepție. Astfel, copiii proveniți din gravide obeze sau mame cu diabet gestational, fiind expuși in-utero la factori multipli dintre care hipoxia fetală, aportul crescut de nutrienți, molecule ale inflamației și dismicrobismului intestinal ce pot produce modificări metabolice cu răsunet asupra acizilor grași, metaboliților, endotoxinelor, acizilor biliari și citokinelor, suferă un „priming” la nivel hepatic pentru NAFLD într-o manieră persistentă și cresc practic susceptibilitatea pentru steato-hepatita non-alcoolică. Mecanicistic vorbind există legături între căile patogenice de la debutul bolii și modificări în metabolismul lipidelor, disfuncții mitocondriale, microbiomul intestinal, programarea macrofagică și modificări epigenetice ce determina modificări hepatice la nivel de micromediu celular, favorizând dezvoltarea de leziuni [36].

### **3. TABLOU CLINIC ÎN NAFLD**

Tabloul clinic în steatoza hepatică non-alcoolică este unul sărac, pacientul putând fi asimptomatic complet sau putând să acuze fatigabilitate și, uneori, durere surdă la nivelul hipocondrului drept, mai ales în cazul în care boala a avansat în stadiul de steatohepatita non-alcoolică (NASH).

### **4. CRITERII DE DIAGNOSTIC ALE STEATOZEI HEPATICE NON-ALCOOLICE ÎN POPULAȚIA PEDIATRICĂ**

Din păcate diagnosticul NAFLD este unul de excludere. Mulți pacienți sunt asimptomatici și diagnosticați cu această patologie din întâmplare. Majoritatea pacienților rămân nediagnosticsați, însă aceștia au un risc mult mai mare comparativ cu populația generală pentru a dezvolta carcinom hepatocelular, complicații metabolice (diabet zaharat de tip 2) sau afectări multiple cardiovasculare. De aceea un diagnostic prompt este necesar pentru a putea iniția pe de o parte un tratament corect ce să reducă progresia bolii și pe de altă parte inițierea măsurilor profilactice în vederea scăderii riscului dezvoltării comorbidităților. Pentru diagnosticul NAFLD

este nevoie în primul rând de o suspiciune clinică și o evaluare serologică extensivă pentru excluderea altor patologii hepatice. Diagnosticul de NAFLD se pune de obicei în medie la vârsta de 11-13 ani [1].

Tabloul clinic este unul nespecific. Pacienții NAFLD pediatrici se pot prezenta cu oboseală, maleză, dureri abdominale în hipocondrul drept. Durerea abdominală a fost corelată cu prezența unei inflamații hepatice și implicit a dezvoltării NASH, însă nu este un simptom cardinal pentru NASH. La examenul clinic se poate remarca o ușoară hepatomegalie, care însă este absentă la mai mult de o jumătate dintre pacienții pediatrici cu NAFLD [45]. Markerii clinici asociați hiperinsulinismului cum este acanthosis nigricans pot fi prezenți [46]. De cele mai multe ori însă pacienții sunt asimptomatici. Asocierea acestor caracteristici clinice, împreună cu prezența factorilor de risc amintiți anterior cresc suspiciunea diagnosticului și îndrumă medicul specialist pentru evaluarea hepatică.

## **5. DIAGNOSTICUL DIFERENȚIAL AL STEATOZEI HEPATICE ÎN CADRUL POPULAȚIEI PEDIATRICE**

Diagnosticul diferențial al afectării hepatice are o importanță covârșitoare în vederea identificării etiologiilor care au viză terapeutică cum ar fi Boala Wilson, boala celiacă sau hepatită autoimună. Atunci când există suspiciunea steatozei hepatice non-alcoolice în populația pediatrică trebuie excluse alte patologii hepatice pe baza unui algoritm dictat de grupa de vârstă a pacientului. Hipertransaminazemia nu este specifică pentru NAFLD sau NASH, putând fi și oglinda unei afecțiuni musculare. Hepatomegalia însoțită de splenomegalie reprezintă semnul clar al unei afecțiuni hepatice în stadiu avansat și obliga la efectuarea cât mai rapidă a biopsiei hepatice precum și a unui bilanț biologic exhaustiv [37].

Trebuie ținut cont în efectuarea diagnosticului diferențial de grupa de vârstă a pacientului pediatric deoarece NAFLD nu este asociat la copilul mic (sub 3 ani) și este o entitate rară la copiii cu vârsta sub 10 ani. La baza diagnosticului diferențial trebuie să stea în primul rând examenul clinic, urmat apoi de profilul biologic și în ultimă instanță de efectuarea biopsiei hepatice [2].

Dintre cauzele de steatoză hepatică la copil și adolescent sunt menționate următoarele entități patologice ce trebuie luate în considerare la efectuarea diagnosticului diferențial [37]:



1. **Afecțiuni sistemice:** anorexia nervosa (+/- realimentare), boala celiacă, diabetul zaharat tip I, Hepatită cu virus C, tulburări hipotalamo-hipofizare, boala inflamatorie intestinală, obezitatea/ sindromul metabolic, sindromul ovarelor polichistice, malnutriția proteino-calorică, scăderea rapidă în greutate, sindromul de poluare bacteriană intestinală, tulburări tiroidiene.
2. **Boli genetice sau metabolice:** defecte ale alfa- și beta-oxidării, abeta- sau hipobetalipoproteinemia, deficitul de alfa-1 antitripsină, boala de depozitare a esterilor de colesterol /LAL, deficitul de citrină, tulburări congenitale ale glicozilării, fibroză chistică, sindromul Shwachmann, hiperlipoproteinemii familiale, boli de depozitare a glicogenului, intoleranța ereditară la fructoză, defecte mitocondriale și peroxizomale, acidozele organice, porfiriea cutană tardă, sindromul Turner, tulburări ale ciclului ureei, boala Wilson.
3. **Consumul de medicamente sau substanțe hepato-toxice:** corticosteroizii, diltiazemul, ecstasy, cocaină, solvenți organici, estrogeni, etanol, metotrexat, nifedipină, pesticidele, valproatul, vitamina A, zidovudina și medicația împotriva HIV.

## 6. TRATAMENT

Terapia steatozei hepatice non-alcoolice reprezintă un domeniu aflat în plină dezvoltare, fiind subiectul de cercetare al multiplelor studii randomizate aflate în desfășurare. Până în momentul actual, singura intervenție cunoscută ca având cu adevărat efect asupra reversibilității afectării hepatice este scăderea în greutate (~ 10% din greutatea corporală) și modificarea stilului de viață. Sunt luate în considerare și o serie de terapii medicamentoase care vin să acționeze la nivelul diferitelor căi metabolice sau de semnalizare intracelulară implicate în patogeneză însă timpul și viitoarele studii vor veni să le aducă validitatea ca și tratament, precum există și viza chirurgicală, în speță chirurgia bariatrică, în cazul pacienților cu obezitate morbidă.

**6.1. Modificarea stilului de viață** – reprezintă prima linie de tratament, însă este un obiectiv greu de atins de către majoritatea pacienților deși este cel mai sigur și mai eficient mod de a vindeca copiii supraponderali/obezi care asociază NAFLD. Dieta și exercițiul fizic au o acțiune sinergică crescând sensibilitatea la insulină, restabilind homeostazia glucozei și lipidelor. Totodată, menținerea pe termen lung (24 luni) a modificării stilului de viață asigură o îmbunătățire a histologiei hepatice prin diminuarea gradului de steatoză și inflamație lobulară. Un

lucru foarte important în cazul pacientului pediatric este reprezentat de implicarea întregii familii în acest proces de modificare a stilului de viață și de scădere în greutate astfel încât copilul să poată fi susținut în acest demers și astfel încât rezultatele să poată fi susținute pe termen lung. Academia Americană de Pediatrie a propus în anul 2007 o abordare etapizată în vederea profilaxiei primare a obezității ca factor primordial în apariția steatozei hepatice non-alcoolice și continuat cu măsuri de tratament.

**6.2 Suplimentarea dietei cu micronutrient**—este o opțiune care a fost investigată de multiple trialuri clinice însă efectele par a fi benefice doar pe termen scurt. Astfel a fost studiată suplimentarea dietei cu vitamine liposolubile (D și E), pre- și probiotice, acizi grași polinesaturati, colină și adiponectină. Dintre toate, suplimentarea dietei cu probiotice astfel încât să fie adusă o modificare benefică în flora saprofită intestinală, este intervenția asociată și cu scăderea în greutate. În NAFLD au fost studiate în extenso efectele în vitro și în vivo ale genurilor *Bifidobacteria* și *Lactobacillus*, cu o atenție aparte asupra *Lactobacillus rhamnosus* a cărui administrare pare să asociază inclusive scăderea nivelului ALT seric la copiii obezi cu NAFLD, însă studii corect conduse, pe perioade lungi de timp și pe un număr semnificativ de pacienți trebuie efectuate pentru a putea stabili cu precizie beneficiul acestora față de placebo [37].

**6.3 Terapia medicamentoasă**—din punct de vedere farmacologic există 3 ținte care pot fi vizate în cadrul pacientului pediatric cu NAFLD: (a) scăderea în greutate, (b) prevenirea sau reversibilitatea steatozei hepatice/ inflamației/fibrozei și (c) tratamentul hipercolesterolemiei.

**6.4 Chirurgia bariatrică** – dedicată pacienților cu obezitate morbidă (IMC >> 99%) cuprinde o serie de tehnici chirurgicale care vizează reducerea volumului gastric, reducerea absorbției alimentelor și inducția unei sațietăți precoce (bypass gastric, baloane intragastrice, bandare ajustabilă gastrică, gastrectomie laparoscopica etc).

## **7. AFECTAREA EXTRAHEPATICĂ ÎN CADRUL STEATOZEI HEPATICE NON-ALCOOLICE**

**7.1. Riscul cardio-vascular** În ultimele decenii, NAFLD a devenit una dintre cele mai frecvente afecțiuni hepatice cronice din întreaga lume, fiind rezultatul obezității și al stilului de viață sedentar. Este lesne de înțeles strânsa legătură dintre steatoza hepatică, obezitate și riscul cardiovascular. Studiile au evidențiat faptul că pacienții cu steatoză hepatică prezintă modificări

chiar subclinice ale afectării cardiovasculare cum ar fi prezența unui IMT carotidian (Intima Media Thickness) mai mare comparativ cu martorii sănătoși [59]. Această asociere a fost identificată și la populația pediatrică, studii conduse pe adolescenți au evidențiat creșterea IMT odată cu creșterea IMC, prezența NAFLD, circumferința abdominală, presiune arterială sistolică, după ce s-a ajustat după prezența altor factori de risc cardiovasculari [60]. În plus, steatoza hepatică a fost asociată cu semne ale disfuncției endoteliale cu valori ale flow mediated dilation (FMD) mai mici la pacienții pediatrici cu NAFLD [61]. Toate aceste studii, deși cu design inferior, fără o componentă prospectivă, pledează pentru afectare cardiovasculară a NAFLD chiar și în cadrul populației pediatrice.

**7.2. Diabetul zaharat de tip 2 (DZT2)** Diabetul zaharat și rezistența la insulină ca și componente ale sindromului metabolic sunt intim legate de prevalența NAFLD și de fapt există o legătură intricată, bidirecțională între NAFLD și DZT2, NAFLD fiind factor independent pentru dezvoltarea diabetului zaharat de tip 2. Prevalența DZT2 sau a prediabetului în cadrul populației cu NAFLD este incertă, studii de mici dimensiuni și cu un design slab, care au folosit metode diferite de diagnostic al NAFLD, au obținut cifre cu variații mari, prevalența variind între 2% și 14%, însă un lucru este sigur și anume: pacienții obezi sau supraponderali supuși screeningului de diabet prin efectuarea testului oral de toleranță la glucoză (TTGO) s-au dovedit a avea o prevalență mai mare a acestei patologii (DZT2 sau prediabet) decât un lot control cu același IMC dar fără NAFLD [70,71].

**7.3. Boala cronică renală** Recent, atenția lumii științifice a fost atrasă asupra unei posibile legături patogenetice între NAFLD și boala cronică renală. Astfel, s-a observat că prezența NAFLD accelerează atât dezvoltarea cât și progresia ulterioară a bolii cronice renale definite fie ca o scădere a ratei de filtrare glomerulară (RFG) sau că prezența microalbuminuriei sau proteinuriei, independent de alți factori de risc clasici implicate în evoluția acesteia, precum diabetul. Mai mult, că și în cazul DZT2, legătura dintre NAFLD și boala renală cronică este una bidirecțională astfel încât afectarea renală per se contribuie ulterior la amplificarea și la progresia afectării hepatice, alimentând cercul vicios [71, 72].

**7.4. Apneea obstructivă de somn** Apneea obstructivă de somn reprezintă în cadrul populației adulte un factor de risc înrădăcinat pentru NAFLD, NASH și fibroză, independent de gen, vârstă și IMC. Două studii efectuate pe populație pediatrică cu NAFLD diagnosticat histologic care au

utilizat evaluarea polisomnografică au arătat o prevalență de aproximativ 60% a apneei obstructive de somn [71].

## **8. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVE GENERALE**

Ca obiectiv principal al acestei teze de doctorat am propus identificarea unor caracteristici clinice și paraclinice ale pacientului pediatric cu steatoză hepatică non-alcoolică (NAFLD – Non-alcoholic Fatty Liver Disease) ce se asociază cu factorii de risc cardiovascular clasici (hipertensiunea, dislipidemia, obezitatea, expunerea la fum de țigară, istoricul familial pozitiv).

Obiectivele secundare ale acestei teze au încercat să atingă problematica estimării prevalenței NAFLD în cadrul populației pediatrice supraponderale/obeze, precum și identificarea în literatura de specialitate a biomarkerilor proteomici specifici pacienților cu NAFLD prin realizarea unei sinteze sistematice și ulterior determinarea serică a biomarkerilor proteomici candidați selecționați prin sinteza sistematică. În final, ne-am dorit identificarea unui/unor markeri surogat pentru evaluarea și stratificarea riscului cardiovascular în populația studiată.

De subliniat importanța realizării unei sinteze sistematice a literaturii de specialitate în vederea identificării unor biomarkeri proteomici candidați în identificarea specifică a steatozei hepatice non-alcoolice, ce a putut servi ulterior ca un bun punct de plecare pentru efectuarea unui studiu specific a câtorva dintre acești biomarkeri pe populația de studiu pediatrică înrolată.

## **10. STUDIUL 1 - BIOMARKERI PROTEOMICI CANDIDAȚI PENTRU FICATUL GRAS NON-ALCOOLIC (STEATOZĂ ȘI STEATOHEPATITĂ NON-ALCOOLICĂ) DESCOPERIȚI PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ: O SINTEZĂ SISTEMATICĂ**

**Introducere:** Obiectivul acestui prim studiu elaborat în cadrul tezei doctorale este acela de a trece în revistă din punct de vedere critic studiile de proteomica ce au folosit ca și tehnică spectrometria de masă și de a sumariza astfel biomarkerii candidați proteomici relevanți pentru NAFLD, urmând astfel calea nebazată pe ipoteze (non-hypothesis driven approach) în descoperirea noilor biomarkeri. Astfel a rezultat o sinteză sistematică a 22 de studii elaborate

după o căutare riguroasă în literatură de specialitate folosind două mari baze de date (Medline și Embase) și identificând 251 de biomarkeri proteomici candidați. Acest prim studiu s-a concretizat într-un articol de tip Sinteza sistematică (Systematic Review) ce a folosit drept indicator rezultat al prezenței teze de doctorat, fiind publicat în **revistă indexată ISI “Biomarkers”** cu **factor de impact >2**. (Trimis în 28 martie 2015, revizuit în 26 mai 2015,

acceptat pentru publicare în 1 noiembrie 2015 și publicat online în 3 decembrie 2015 ). [83 ]

**Materiale și metode :**Au fost interogate două baze de date electronice (Medline/Pubmed și Embase) pentru articolele de interes de la începuturi până la 20 Decembrie 2014. A fost folosită o strategie de căutare care a avut o abordare diferită pentru cele două baze de date. Au fost incluse în analiză numai articolele în limba engleză. După aplicarea criteriilor de includere și excludere au fost definite înregistrările finale din care se face extracția informației. Fiecare înregistrare a fost citită integral și datele au fost extrase într-o fișă. Dacă înregistrarea era un abstract de conferință datele au fost extrase din rezumat și eventual din tabelele atașate.

#### **Rezultate obținute din sinteza sistematică a biomarkerilor identificați din literatură**

În final au fost evaluate 22 de înregistrări: 12 articole originale, o comunicare (articol tip *short communication*) și 9 înregistrări tip abstract conferință. Majoritatea studiilor (21 din 22) se referă la NAFLD adult și un singur studiu se referă la NAFLD pediatric. În total au fost identificați 251 de biomarkeri proteomici candidat pentru pacienții cu NAFLD. Acești biomarkeri au avut expresie semnificativ statistic modificată față de grupul martor, fiind fie supraexpresiați fie subexpresiați comparativ cu grupul martor. Marea majoritate a biomarkerilor au fost supraexpresiați (127 de biomarkeri), în timp ce 99 de biomarkeri aveau expresie semnificativ statistic mai mică. Pentru 25 de biomarkeri studiile au găsit rezultate contradictorii (în unele studii aceștia erau fie supraexpresiați, fie subexpresiați). Acești biomarkeri sunt platelet basic protein, lanțul  $\gamma$  al fibrinogenului fibrinogen chain, protrombina, componenta C7 a complementului, actina, lumicanul, CD5 antigen like, apolipoproteina A1, apolipoproteina A2, apolipoproteina A4, apolipoproteina B100,  $\alpha 2$  acid glycoprotein zinc, albumina, lanțul  $\beta$  a hemoglobinei, fatty acid binding protein 1, cistatin C, IGFBP3, un fragment a proteinei numite myosin reactive immunoglobulin heavy chain variable region, 78 kDa glucose regulated protein precursor, calreticulina, endoplasmul, lanțul ușor al feritinei, Hsp 90 $\beta$ , Hsp 90 $\alpha$  și izoforma 1 a carboxilazei hepatice.

Comparând biomarkerii identificați în diferite probe biologice și încercând să intersectăm aceste mulțimi, s-a observat că numai 9 biomarkeri au fost identificați și cu expresie modificată atât în sângele periferic (ser sau plasma) și în probele hepatice ale pacienților cu NAFLD. Acești biomarkeri sunt glicoproteina  $\alpha$ -1 acidă, actina, lumicanul, albumina, hemoglobina  $\beta$ , apolipoproteina A1, proteinele glicate/lipoxidate cu un rest final N-epsilon carboximetil lizină, 78 kDa glucose regulated protein precursor și carbamoil fosfat sintaza I.

În total 33 de biomarkeri au fost validați (lumicanul, fatty acid binding protein 1, proteinele glicate/lipoxidate cu un rest final N-epsilon carboximetil lizină, apolipoproteina AII, catalaza, Cd14, CD5L, cistatinul C, hemopexina, IGFBP3, LCP1, trombospondina, apolipoproteina B100, apolipoproteina E, component C3 a complementului, afamina, retinol Binding Protein 4, Vitamin D Binding Protein precursor, 78 kDa glucose regulated protein precursor, carbamoil fosfat sintaza I, actina, calumenina, calreticulina, proteina 14-3-3 epsilon, peroxiredoxina-4, Hsp 90,  $\alpha$ -1 glicoproteina acidă, perilipin 2, 17-beta-hidroxisteroid dehidrogenaza 13 izoforma B, lanțul  $\alpha$  hemoglobin, lanțul  $\beta$  hemoglobină, component C3f a complementului, fibrinopeptidul A. Dintre acești 33 de biomarkeri, majoritatea (21) au fost validați din serul pacienților și 14 biomarkeri din probele biopsice hepatice. Doar doi biomarkeri, 78 kDa glucose regulated protein precursor (Grp78/BiP) și carbamoil fosfat sintaza I au fost validați atât din ser cât și din probele biopsice ale pacienților.

**Concluzii :** Această sinteză sistematică a identificat 251 biomarkeri proteomici candidați pentru diagnosticul și prognosticul NAFLD. Câțiva dintre acești biomarkeri au fost deja extensiv studiați cu privire la capacitatea lor diagnostică. Cu toate acestea rămân însă mulți alți potențiali biomarkeri care necesită studii viitoare în vederea aprofundării lor. Identificarea biomarkerilor exprimați atât seric cât și din probele de biopsie hepatică și care pot reflecta fidel gradul de inflamație, fibroză și steatoză hepatică ar putea duce la evitarea unor proceduri diagnostice invazive și costisitoare și ar putea îmbunătăți urmărirea pacienților. NAFLD este un spectru de boală care se asociază cu risc crescut cardio-vascular și cu biomarkeri care sunt comuni evenimentelor cardiovasculare și care influențează suplimentar prognosticul pacientului. Suplimentar, combinarea biomarkerilor în panouri ar putea în final crește acuratețea lor diagnostică și valoarea prognostică. Chiar dacă deja există modalități valide de diagnostic,

rămâne necesară descoperirea unor markeri non-invazivi utili pentru NAFLD, cu precădere în evaluarea prognosticului.

## **11. STUDIUL 2 - PROFILUL LIPIDIC AL PACIENȚILOR SUPRAPONDERALI PEDIATRICI (CE PREZINTĂ SAU NU STEATOZĂ HEPATICĂ NON-ALCOOLICĂ) ÎN RELAȚIE CU CRITERIILE IDF PENTRU DEFINIREA SINDROMULUI METABOLIC**

**Introducere:** În vederea continuării investigației problematice sus menționate, scopul acestui studiu este de a analiza profilul lipidic al populației supraponderale pediatrice (ce are sau nu NAFLD) în raport cu criteriile IDF pentru definirea sindromului metabolic la copii și adolescenți.

Datele **preliminare** ale acestui studiu (**primii 45 de pacienți**) au stat la baza unui studiu pilot și au fost prezentate în articolul științific “*Lipid profile pattern in pediatric overweight population with or without NAFLD in relation to IDF criteria for metabolic syndrome: a preliminary study*” – Bălănescu A et al., publicat în numărul 1 din 2018 al **Romanian Journal of Internal Medicine** ca parte integrantă a lucrării științifice și ca indicator rezultat al tezei de doctorat [110].

**Materiale și metode:** A fost realizat un studiu transversal pe **71 copii** consecutivi care s-au prezentat în perioada Ianuarie- Decembrie 2017 la Institutul Național pentru Sănătatea Mamei și Copilului Alessandrescu-Rusescu, din București. Au fost incluși în studiu pacienți cu vârste cuprinse între 3 și 18 ani. Indicii antropometrici au fost măsurați și notați pentru fiecare pacient în parte. Pacienții au fost evaluați biochimic pentru analiza statusului inflamator (proteina C reactivă serică), a fost analizat profilul lipidic (colesterol total, fracțiuni și valorile serice ale TG), glicemie a jeune, hemogramă cu analiza indicilor și analiza funcției hepatice. Toți pacienții au fost evaluați pentru decelarea steatozei hepatice ecografic. S-a folosit ecograful Toshiba Aplio 300. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică și părinții au semnat consimțământ informat pentru includerea în studiu conform Declarației de la Helsinki. Toate datele au fost analizate folosind softul SPSS versiunea 16 pentru Windows.

**Rezultate:** Au fost incluși 71 pacienți (37 băieți = 52.1% și 34 fete = 47.9%), cu o mediană a varstelor la 10 ani (varsta minimă-3 ani, varsta maximă-17 ani). Prevalența Sindromului Metabolic a fost de 36.6% (26 pacienți). Un număr de 29 pacienți (40.8%) au avut NAFLD. Un număr de 34 pacienți au avut varsta sub 10 ani, iar 9 dintre ei întruneau toate criteriile necesare stabilirii diagnosticului de sindrom metabolic, în ciuda vârstei mici. 17 dintre pacienții subgrupului cu varsta peste 10 ani au întrunit toate criteriile necesare diagnosticului de sindrom Metabolic. 29 (40.8%) dintre pacienții recrutați au avut NAFLD. Pacienții cu NAFLD au avut niveluri semnificativ statistic mai mari ale vârstei, IMC, trigliceride serice, raport TG/HDL, ale valorilor ALT, AST și fosfataza alcalină.

Pacienții cu NAFLD au avut niveluri semnificativ statistic mai mici ale fracției HDL-colesterolului. Pacienții cu sindrom metabolic au avut un risc mai mare pentru prezența NAFLD (OR=3.94 95% interval încredere CI=1.42-10.91). Pacienții cu diabet zaharat tip 2 în antecedentele familiale au avut un risc mai mare de a avea NAFLD (OR=4.90, 95% CI 1.74-13.94).

În lotul nostru, 26 pacienți au îndeplinit criteriile de sindrom metabolic (16 cu NAFLD și 10 fără NAFLD). Exceptând criteriul referitor la valoarea percentilei taliei >90, cel mai frecvent criteriu îndeplinit a fost nivelul scăzut al HDL-colesterolului (33 pacienți, 46.5%). Un număr semnificativ statistic mai mare de pacienți din subgrupul cu NAFLD au îndeplinit atât criteriul de hipertrigliceridemie cât și pe cel de HDL colesterol scăzut. De remarcat este faptul că s-au aplicat criteriile IDF indiferent de vârsta pacienților (sub sau peste vârsta de 10 ani).

Pentru a verifica dacă sunt diferite în subgrupul de pacienți sub 10 ani, a fost realizată o analiză a criteriilor IDF strict pe acești pacienți (34 pacienți). Și în cadrul acestui subgrup riscul de a avea NAFLD la pacienții cu sindrom metabolic a fost mai mare (OR=6.33 95% CI 1.20-33.38). Cel mai frecvent criteriu îndeplinit a fost de asemenea nivelul scăzut de HDL colesterol (12, 41.2%).

Varsta s-a corelat pozitiv cu nivelurile TG ( $r=0.50$ ,  $p<0.001$ ) și cu raportul TG/HDL ( $r=0.46$ ,  $p<0.001$ ). Astfel că este necesară ajustarea nivelurilor TG serice pentru vârsta pentru a vedea dacă se asociază independent cu prezența NAFLD și a sindromului metabolic. În analiza multivariată, având TG ca variabilă dependentă, TG s-au asociat independent cu prezența NAFLD (valoare  $R^2$  ajustată a modelului 0.40, coeficient B nestandardizat pentru NAFLD 34.09,



IC 95% 12.57-55.61). Surprinzător nivelurile HDL colesterol nu au mai fost asociate în analiza multivariată cu NAFLD după ce s-a ajustat pentru vârsta și prezenta sindromului metabolic.

De altfel s-a căutat și valoarea predictivă pe care o pot avea nivelurile serice ale TG pentru a pune diagnosticul de NAFLD. Pentru aceasta s-a realizat o curbă ROC. AUC a fost bună pentru diagnosticul NAFLD, fiind de 0.76 CI 95% 0.64-0.88. Pentru o valoare prag a TG de 95 mg/dL, acest biomarker are specificitate 67% și sensibilitate 79% pentru diagnosticul NAFLD în cadrul populației pediatrice.

**Concluzii și direcții de perspectivă:** În concluzii acest studiu confirmă date precedente din literatura și descrie un pattern particular al profilului lipidic la pacienții supraponderali și obezi cu NAFLD. Pacienții obezi cu NAFLD comparativ cu cei supraponderali non-NAFLD au avut o prevalență mai mare a sindromului metabolic, valori mai mari ale IMC și un profil lipidic particular (niveluri scăzute ale HDL colesterolului cu creșteri ale valorilor TG serice și modificarea profundă a TG/HDL-colesterolului). Nivelul TG serice s-a asociat independent cu NAFLD după ce s-a produs ajustarea pentru vârstă și sindrom metabolic. Conform acestor rezultate, testarea precoce (inclusiv la pacienții sub 10 ani) a nivelului trigliceridelor serice la anumite grupe selecționate de pacienți (copii supraponderali și obezi cu istoric familial de diabet tip 2) ar aduce beneficii pentru identificarea acelor copii cu sindrom metabolic. Astfel s-ar putea identifica NAFLD și sindromul metabolic încă de la vârste fragede și, deși criteriile IDF nu pot fi aplicate, se impune o urmărire atentă a acestor pacienți.

## **12. STUDIUL 3 - EVALUAREA UNUI PANEL DE BIOMARKERI CANDIDAT LA PACIENȚII PEDIATRICI CU OBEZITATE CE ASOCIAZĂ SAU NU NAFLD**

**Introducere :** Obiectivul studiului a fost de a evalua și de a confirma un panel de biomarkeri candidat identificat din studii de proteomică fundamentală la pacienții pediatrici supraponderali și obezi precum și de a cerceta capacitățile predictive ale acestora sau asocierea cu anumite caracteristici clinice și/sau biologice.

**Materiale și metode:** A fost realizat un studiu transversal pe **68 copii** consecutivi care s-au prezentat în perioada Ianuarie- Decembrie 2017 la Institutul Național pentru Sănătatea Mamei și Copilului Alessandrescu-Rusescu, din București. Au fost incluși în acest studiu pacienți cu

vârste cuprinse între 3 și 18 ani din cohorta MR PONY la care s-a putut realiza prelevarea și stocarea de probe biologice la - 80 grade C.

Pentru compararea nivelurilor serice ale biomarkerilor de evaluat au fost incluși în studiu și 10 martori sănătoși împerecheați pe vârste și gen. Aceștia au fost selecționați dintre pacienții prezentați în perioada ianuarie – aprilie 2018 la INSMC “Alessandrescu- Rusescu”. Pacienților incluși în studiu le-au fost recoltate probe biologice standardizat conform protocolului de lucru astfel că s-au prelevat probe pentru analize biochimice uzuale din care s-a păstrat probă în cadrul serotecii. Pentru detecția biomarkerilor proteomici relevanți din cadrul studiului a fost folosită tehnica ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) „sandwich” fiind utilizate truse comerciale. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică și părinții au semnat consimțământ informat pentru includerea în studiu conform Declarației de la Helsinki. Toate datele au fost analizate folosind softul SPSS versiunea 16 pentru Windows.

**Rezultate:** Au fost incluși 68 pacienți (35 baieti = 51.5% și 33 fete = 48.5 %), cu o mediană a varstelor la 10 ani (varsta minimă- 3 ani, varsta maximă- 17 ani). Prevalența Sindromului Metabolic a fost de 36.8 % (25 pacienți). Un număr de 26 pacienți (38.2%) au avut NAFLD din care 7 pacienți au avut NASH. Indicele HOMA-IR median a fost de 2.20 cu valoare minimă 0.34 și maximă 13.57.

Față de martorii sănătoși, pacienții supraponderali și obezi au avut niveluri semnificativ crescute mai mari ale nivelurilor Hsp-90 beta, CXCL-4 și Hsp-60 astfel că acești biomarkeri ar putea fi utili în evaluarea pacienților supraponderali și obezi.

Au fost definite valori prag ale biomarkerilor de interes, având în vedere faptul că în literatura de specialitate nu sunt date referitor la concentrațiile acestora în populația pediatrică. Această valoare prag a fost considerată ca fiind valoarea mediei martorilor sănătoși la care se adaugă 2 deviații standard. Pentru Hsp-90 beta această valoare a fost stabilită la 3.68 ng/mL (1.94 + 2X 0.87). Pentru Hsp-90 alfa această valoare a fost stabilită la 31.17 ng/mL (13.07 + 2 X 9.05). Pentru lumican această valoare a fost stabilită la 17.29 ng/mL (13.03+ 2 X 2.13) iar pentru CXCL4 această valoare a fost stabilită la 1668.41 pg/mL (1415.77 + 2 X 126.32).

Nivelurile serice ale insulinei au fost semnificativ statistic mai mari la pacienții cu NAFLD față de cei fără NAFLD (mediana insulină 16.89 mU/L (2.05-41.57) versus mediana insulină 7.71 mU/L (0.96-41.41), p=0.015, test Mann-Whitney U.

În plus, HOMA-IR a fost semnificativ statistic mai mare la pacienții cu NAFLD față de cei fără NAFLD (mediana HOMA-IR 3.69 (0.55-10.57) versus mediana HOMA-IR 1.67 (0.34-13.91),  $p=0.006$ , test Mann-Whitney U).

Pacienții cu NAFLD au avut un risc de 3.73 ori mai mare față de cei din grupul non-NAFLD să aibă rezistența la insulină (OR=3.73, 95% CI 1.30-10.64,  $p=0.010$ ).

Au fost observate diferențe semnificative statistic între pacienții cu steatoză și cei fără steatoză pentru Hsp-90 beta și Hsp-90 alfa. Astfel, nivelurile serice ale Hsp-90 beta au fost semnificativ statistic mai mari la pacienții cu NAFLD față de cei fără NAFLD (mediana 6.46 ng/mL (0.38-30.73) versus 3.95 ng/mL (0.14-98.37),  $p=0.046$ , test Mann-Whitney U). Un aspect surprinzător este legat de nivelurile Hsp-90 alfa. Nivelurile serice ale Hsp-90 alfa au fost semnificativ statistic mai mici la pacienții cu NAFLD față de cei fără NAFLD (mediana 11.41 ng/mL (3.59-119.85) versus 18.83 ng/mL (0-105.4),  $p=0.049$ , test Mann-Whitney U). Nu s-au observat diferențe semnificative statistic între ceilalți biomarkeri la pacienții cu steatoză hepatică și cei fără steatoză hepatică. Făcând comparația între pacienții obezi și cei supraponderali, nu s-au observat diferențe semnificative statistic între nivelurile biomarkerilor, însă s-a putut observa o tendință ca pacienții obezi să aibă niveluri mai mari ale Hsp-60 circulante. Totuși, numărul mic de pacienți supraponderali comparat cu cel de obezi nu poate exclude prezența unei erori de tip II (diferențele dintre aceste două grupuri nu au putut fi evidențiate pentru că erau puțini pacienți într-unul din grupuri). Comparând nivelurile biomarkerilor dintre pacienții cu NASH și ceilalți pacienți s-a observat o tendință a nivelurilor crescute ale Hsp-60 la cei cu NASH (mediană 1.31 ng/mL (0-5.96) versus 0 ng/mL (0-3.47),  $p=0.051$ , Mann Whitney U). Curba ROC realizată pentru evaluarea Hsp-60 ca test diagnostic pentru NASH are aria de 0.69 (interval de încredere 95% între 0.44-0.93). Pentru o valoarea prag de 4.33 ng/mL, Hsp-60 este 100% specifică pentru NASH însă sensibilitatea este de doar 29%.

Am considerat prag pentru a defini hipertensiunea diastolică (HTAd) o valoare  $>$  sau egală cu P95% pentru vârstă, talie și gen. Nu s-au găsit diferențe semnificative statistic însă sunt de subliniat câteva tendințe de asociere statistică. Astfel, s-a observat o tendință de asociere la pacienții cu HTAd cu antecedentele heredocolaterale de diabet zaharat de tip 2 (12 pacienți=54.5% versus 17 pacienți=36.2% cu  $p=0.19$ , Test Fisher Exact). Altă tendință de asociere între HTAd s-a observat cu valoarea Lumicanului considerată înaltă în binarizare (pragul este cel considerat în prezentat în secțiunea de Materiale și metode) – 6 pacienți=28.6% versus 7 pacienți=14.9%,

p=0.20 (Test Fisher Exact). Tot tendință de asociere statistică s-a observat între HTAd și valoarea CXCL4 considerată înaltă în binarizare (pragul stabilit este cel descris în secțiunea de material și metode) - 3 pacienți= 14.3% versus 2 pacienți=4.3% cu p=0.16 (Test Fisher Exact). Pacienții cu HTAd prezintă și o tendință de a avea o percentilă a circumferinței brațului mai mare (mediana se situează la percentile de 95 cu valoare minimă de 50% și maximă de 99% versus o mediană la percentile de 93% cu o valoare minimă de 25% și maximă de 99%). Nu în ultimul rând menționăm asociere statistică între valoarea scăzută a MCV și prezența HTAd (mediana 77.10 fl cu valori minime de 59.3 fl și maxime de 87.2 fl versus mediană la 79.4 fl cu valoare minimă de 59.2 fl și maximă de 86.5 fl, p=0.020, Test Mann-Whitney).

Pentru a evalua asocierea obezității cu factorii de risc cardiovasculari și biomarkerii considerați am comparat pacienții cu Z-score IMC  $\geq 2$  față de cei cu Z-scor IMC sub 2. Astfel, pacienții cu Z-score IMC  $\geq 2$  au avut mai frecvent antecedente heredocolaterale pozitive pentru DZT2 (20 pacienți= 55.6% versus 9 pacienți=27.3%, p=0.02, test Fisher Exact). În acest caz riscul în cazul celor cu istoric familial de DZT2 la ruda de gradul I pentru a avea obezitate morbidă este de 3.33 mai mare (OR=3.33, 95% CI, 1.21-9.14, p=0.02). Pacienții cu Z-score IMC  $\geq 2$  au întrunit mai frecvent criteriul de hipertrigliceridemie din diagnosticul de sindrom metabolic propus de către IDF (chiar dacă nu au fost întrunite toate criteriile pentru susținerea diagnosticului de sindrom metabolic) – 14 pacienți=36.8% versus 5 pacienți=15.2%, p=0.05, test Fisher Exact. S-a observat o tendință de asociere între Z-score IMC  $\geq 2$  cu valoarea Hsp90 beta considerată înaltă prin binarizare (pragul este cel considerat în secțiunea de Materiale și metode) – 27 pacienți=73% versus 16 pacienți=51.6%, p=0.08, test Fisher Exact. În mod interesant, pacienții cu Z-score IMC  $\geq 2$  au avut vârste mai mici (mediana vârstelor s-a situat la 8 ani cu o minimă de 3 ani și o maximă de 16 ani versus mediana vârstelor la 11 ani pentru cei cu Z-scor IMC sub 2, minim 5 ani-maxim 17 ani, p= 0.01, test Mann-Whitney). Pacienții cu Z-score IMC  $\geq 2$  au avut scoruri de fibroză hepatică PNFI semnificativ statistic mai mari (mediană 10 puncte cu minim 2 puncte și maxim 10 puncte versus mediana 7 puncte cu minim 0 puncte și maxim 10 puncte, p<0.001, test Mann-Whitney). Pe de altă parte, pacienții cu Z-score IMC  $\geq 2$  au avut scoruri FIB-4 utilizat în aprecierea fibrozei hepatice în populația adultă semnificativ statistic mai mici (mediană 0.10, minim 0.03 - maxim 0.21 versus mediană 0.15 cu minim 0.04 - maxim 0.47, p<0.001, Test Mann-Whitney).

## **Concluzii**

1. Pacienții pediatrici supraponderali și obezi care asociază NAFLD au un risc mai mare de a avea și rezistență la insulină. Fiind un studiu transversal nu putem afirma cu certitudine dacă asocierea NAFLD este cauza apariției rezistenței la insulină sau rezistența la insulină duce la dezvoltarea NAFLD.

2. Hsp-90 beta, CXCL-4 și Hsp-60 au expresie crescută la pacienții pediatrici supraponderali și obezi.

3. Hsp-90 beta și Hsp-90 alfa au fost confirmați biomarkeri pentru NAFLD la pacienții pediatrici supraponderali și obezi. Expresia lor pare să fie însă diferențiată (niveluri mai mari ale Hsp-90 beta și niveluri mai mici ale Hsp-90 alfa).

4. Lumicanul seric la pacienții supraponderali și obezi a avut tendința de asociere cu niveluri mai mari ale tensiunii arteriale diastolice.

5. Deși Hsp-60 a fost modest exprimat la pacienții selecționați, totuși am putut stabili o valoare prag pentru care acest biomarker are specificitate de 100 % pentru diagnosticul de NASH (cu o sensibilitate foarte proastă, însă).

6. În analiza statistică a datelor acumulate nu s-au observat asocieri semnificative între factorii de risc cardiovascular clasici și nivelurile circulante ale biomarkerilor evaluați.

## **CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE**

Prezenta lucrare și-a atins obiectivele propuse. Pentru atingerea acestora a fost realizată o sinteză sistematică a tuturor biomarkerilor candidat proteomici care au fost identificați prin metode de spectrometrie de masă din probe biologice ale pacienților cu steatoză hepatică, NASH sau sindrom metabolic. Această sinteză sistematică reprezintă o importantă sursă bibliografică pentru întreaga comunitate academică internațională, aceasta sumarizând biomarkerii relevanți ce ulterior trebuie confirmați prin studii independente pentru a le putea evalua capacitățile diagnostice și prognostice atât în cadrul populației adulte cât și în cadrul populației pediatrice. Astfel că prin publicarea acestei sinteze sistematice literatura de specialitate s-a îmbogățit, lucrarea fiind deja citată de mai multe grupuri internaționale ce cercetează biomarkeri și metode de diagnostic și prognostic în NAFLD.

Din cei 251 de biomarkeri candidat identificați în cadrul sintezei sistematice au fost selectați anumiți biomarkeri promițători care au fost evaluați în cadrul unui lot de pacienți pediatrici supraponderali și obezi, alături de profilul lipidic în încercarea de a evidenția anumite asocieri dintre parametrii biologici și factorii de risc cardiovasculari pe care acești pacienți îl au și de a le evalua capacitatea de a putea orienta clinicianul pentru diagnosticul de steatoză hepatică. De remarcat este faptul că biomarkerii au fost analizați pentru prima oară în literatură în cadrul acestei teze de doctorat, fiind propuse și valori de referință pentru populația pediatrică. Este însă de subliniat faptul că pentru a putea avea valori relevante prag ale normalului sunt necesare studii viitoare ample pe diferite grupe de vârstă. Astfel este subliniat încă o dată înaltul grad de originalitate al lucrării de doctorat, fiind prima lucrare științifică care a raportat asocieri ale acestor biomarkeri cu caracteristici ale pacienților pediatrici supraponderali și obezi ce au avut sau nu NAFLD. Lucrarea de față reprezintă un punct important de plecare pentru viitoare studii longitudinale, prospective care să aducă mai multe informații privind capacitatea prognostică a biomarkerilor.

Sumarizand, pe baza datelor obținute în cadrul tezei de doctorat se pot trage următoarele concluzii:

1. În cadrul literaturii de specialitate există mai multe studii care au identificat biomarkeri candidat pentru expresia clinică NAFLD și din care o mare parte nu au fost încă confirmați în cadrul unor studii independente.
2. Pacienții pediatrici supraponderali și obezi cu NAFLD au o prevalență mai mare a sindromului metabolic, rezistență la insulină și valori mai mari ale IMC.
3. Există un pattern particular al profilului lipidic la pacienții supraponderali și obezi cu NAFLD reprezentat de niveluri scăzute ale HDL colesterolului cu creșteri ale valorilor TG serice și modificarea profundă a TG/HDL-colesterolului
4. Nivelul TG serice s-a asociat independent cu NAFLD după ce s-a produs ajustarea pentru vârstă și sindrom metabolic. De altfel TG serice par să fie cel mai bun biomarker din cei analizați care să distingă steatoza hepatica la pacienții pediatrici supraponderali și obezi.
5. Testarea precoce (inclusiv la pacienții sub 10 ani) a nivelului trigliceridelor serice la anumite grupe selecționate de pacienți (copii supraponderali și obezi cu istoric

familial de diabet tip 2) ar aduce beneficii pentru identificarea acelor copii cu sindrom metabolic și steatoză hepatică.

6. Pacienții supraponderali și obezi au niveluri serice ale Hsp-90 beta, CXCL-4 și HSP-60 crescute comparative cu populația sănătoasă.
7. Dintre biomarkerii analizați au putut fi confirmați în cadrul populației pediatrice drept biomarkeri pentru NAFLD numai Hsp-90 beta și Hsp-90 alfa. Expresia lor pare să fie însă diferențiată (niveluri mai mari ale Hsp-90 beta și niveluri mai mici ale Hsp-90 alfa fiind asociate cu prezența NAFLD pediatric).
8. Hsp-60 pare să fie un biomarker cu o înaltă specificitate pentru diagnosticul de NASH (cu o sensibilitate foarte proastă, însă). Studii viitoare care să se concentreze pe această asociere și care să evalueze un lot mai mare de pacienți pediatrici cu NASH sunt necesare pentru stabilirea unor valori prag.
9. Factorii de risc cardiovasculari nu s-au asociat cu valorile circulante ale biomarkerilor analizați.

## BIBLIOGRAFIE

1. Vajro P, Lenta S, Socha P, et al. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*;54(5):700-13, 2012
2. Vos MB, Abrams SH, Barlow SE, et al.. 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). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*;64(2):319-34, 2017
3. World Health Organisation. Mediacentre factsheets: Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> accesat în 4 mai 2017.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Overweight & Obesity – Children: Defining Childhood Obesity <https://www.cdc.gov/obesity/childhood/defining.html> accesat în 4 mai 2017.
5. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, et al.; IDF Consensus Group.. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes.* ;8(5):299-306, 2007
6. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction în Children and Adolescents.; National Heart, Lung, and Blood Institute.. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction în children and adolescents: summary report. *Pediatrics.* 128 Suppl 5:S213-56, 2011

7. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*;114(2 Suppl 4th Report):555-76, 2004
8. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*;123:745-50, 2002
9. Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard JB. Liver histology in a 'normal' population—examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scand J Gastroenterol*;12:593-97, 1977
10. Shen L, Fan JG, Shao Y, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. *World J Gastroenterol*; 9:1106-10, 2003
11. Liangpunsakul S, Chalasani N. Unexplained elevations in alanine aminotransferase in individuals with the metabolic syndrome: results from the third National Health and Nutrition Survey (NHANES III). *Am J Med Sci*;329:111-16, 2005
12. Anderson EL, Howe LD, Jones HE, et al. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*.;10(10):e0140908, 2015
13. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci*;40:2002-9, 1995
14. Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH. Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. *J Pediatr*;136:727-33, 2000
15. Doycheva I, Watt KD, Alkhoury N. Nonalcoholic fatty liver disease in adolescents and young adults: The next frontier in the epidemic. *Hepatology*.;65(6):2100-9, 2017
16. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* ; 29: 113–9, 2009
17. Prashanth M, Ganesh HK, Vima MV, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Assoc Physicians India* ; 57: 205–10. 2009
18. Cerda C, Pérez-Ayuso RM, Riquelme A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *J Hepatol*; 47: 412–7, 2007.
19. Ong JP, Elariny H, Collantes R, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg*; 15: 310–5, 2005
20. Adriano LS, Sampaio HA, Arruda SP, Portela CL, Melo ML, Carioca AA, Soares NT. Healthy dietary pattern is inversely associated with non-alcoholic fatty liver disease in elderly. *Br J Nutr*.;115(12):2189-95, 2017
21. Musso G., Gambino R., De Michieli F., et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*; 37: 909–16, 2003
22. Zelber-Sagi S, Godos J, Salomone F. Lifestyle changes for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a review of observational studies and intervention trials. *Therap Adv Gastroenterol*.;9(3):392-407, 2016
23. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*.; 98:960–7, 2003
24. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*;122:1649–57, 2002



25. Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, et al. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* ; 40: 475–83, 2004
26. Fallo F, Dalla Pozza A, Tecchio M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in primary aldosteronism: a pilot study. *Am J Hypertens* 23: 2–5, 2010
27. Shieh K, Gilchrist JM, Promrat K. Frequency and predictors of nonalcoholic fatty liver disease in myotonic dystrophy. *Muscle Nerve*; 41: 197–201, 2010
28. Nobili V, Alisi A, Panera N, et al. Low birth weight and catch-upgrowth associated with metabolic syndrome: a ten year systematic review. *Pediatr Endocrinol Rev*;6:241–7, 2008
29. Nobili V, Bedogni G, Alisi A, et al. A protective effect of breastfeeding on the progression of NAFLD. *Arch Dis Child*;94:801–5, 2009
30. Newton KP, Feldman HS, Chambers CD, et al. Low and High Birth Weights Are Risk Factors for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN). *J Pediatr*. pii: S0022-3476(17)30356-6, 2017
31. Cioffi CE, Welsh JA, Cleeton RL, et al. Natural History of NAFLD Diagnosed in Childhood: A Single-Center Study. *Children (Basel)*. ;4(5) pii: E34, 2017
32. Nascimbeni F, Păiș R, Stefano Bellentani S et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *Journal of Hepatol*;59:859-71, 2013
33. Feldstein AE, Charatcharoenwithaya P, Treeprasertsuk S, et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years. *Gut*.;58(11):1538-44, 2009
34. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*.;114(4):842-5, 1998
35. Charlton M. Noninvasive indices of fibrosis in NAFLD: starting to think about a three-hit (at least) phenomenon. *Am J Gastroenterol*.;102(2):409-11, 2007
36. Wesolowski SR, Kasmi KC, Jonscher KR, et al. Developmental origins of NAFLD: a womb with a clue. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 14(2):81-96, 2017
37. Clemente MG, Mandato C, Poeta M, et al. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: Recent solutions, unresolved issues, and future research directions. *World J Gastroenterol*.;22(36):8078-93, 2016
38. Hârșova P, Gores GJ. Ballooned hepatocytes, undead cells, sonic hedgehog, and vitamin E: therapeutic implications for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*.;61(1):15-7, 2015
39. Arias-Loste MT, Iruzubieta P, Puente Á, et al. Increased Expression Profile and Functionality of TLR6 in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Hepatocytes of Morbidly Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*.;17(11), 2016
40. Zhu Y, Liu H, Zhang M, et al. Fatty liver diseases, bile acids, and FXR. *Acta Pharm Sin B*.;6(5):409-12, 2016
41. Engstler AJ, Aumiller T, Degen C, et al. Insulin resistance alters hepatic ethanol metabolism: studies in mice and children with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*.;65(9):1564-71, 2016
42. Shi D, Zhan X, Yu X, et al. Inhibiting CB1 receptors improves lipogenesis in an in vitro non-alcoholic fatty liver disease model. *Lipids in Health and Disease*.;13:173, 2014

43. Rossi F, Bellini G, Alisi A, et al. Cannabinoid Receptor Type 2 Functional Variant Influences Liver Damage in Children with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. La frenie R, ed. *PLoS ONE*.;7(8):e42259, 2012
44. Zhang SR, Fan XM. Ghrelin-ghrelin O-acyltransferase system in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology :WJG*. ;21(11):3214-22, 2015
45. Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, et al. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr*;143:500–5, 2003
46. Boyraz M, Hatipoglu N, Sari E et al. Non-alcoholic fatty liver disease in obese children and the relationship between metabolic syndrome criteria. *Obes. Res. Clin. Pract.* ; 8: e356–e363, 2014
47. Schwimmer JB, Dunn W, Norman GJ, et al. SAFETY study: alanine aminotransferase cutoff values are set too high for reliable detection of pediatric chronic liver disease. *Gastroenterology*;138:1357–64, 2010
48. Tahan V, Canbakan B, Balci H, et al. Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology*; 55:1433–8, 2008
49. Cambuli VM, Incani M, Pilia S, et al. Oral glucose tolerance test in Italian overweight/obese children and adolescents results in a very high prevalence of impaired fasting glycaemia, but not of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*;25:528–34, 2009
50. Engiz O, Berberoglu M, Siklar Z, et al. Risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in obese children. *Horm Res*;72:63–4, 2009
51. Mansoor S, Collyer E, Alkhouri N. A comprehensive review of noninvasive liver fibrosis tests in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep*.;17(6):23, 2015
52. Nobili V, Alisi A, Vania A, et al. The pediatric NAFLD fibrosis index: a predictor of liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med.*; 7:21, 2009.
53. Alkhouri N, Mansoor S, Giammaria P, et al. The Development of the Pediatric NAFLD Fibrosis Score (PNFS) to Predict the Presence of Advanced Fibrosis in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Tsokos M, ed. *PLoS ONE*.;9(8):e104558, 2014.
54. Shannon A, Alkhouri N, Carter-Kent C, et al. Ultrasonographic quantitative estimation of hepatic steatosis in children With NAFLD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.;53(2):190-5, 2011
55. Dendl LM, Schreyer AG. Steatohepatitis—a challenge?; *Der Radiologe* 52(8):745–2, 2012;
56. Jacobs J. E., Birnbaum B. A., Shapiro M. A., et al. Diagnostic criteria for fatty infiltration of the liver on contrast-enhanced helical CT. *American Journal of Roentgenology*. ;171(3):659–64, 1998
57. Manning P, Murphy P, Wang K, et al. Liver histology and diffusion-weighted MRI in children with nonalcoholic fatty liver disease: A MAGNET study. *J Magn Reson Imaging*. doi: 10.1002/jmri.25663 (e-pub ahead of print) , 2017
58. Villanueva MT. Liver disease: Conscious uncoupling in NASH. *Nat Rev Drug Discov*.;16(4):238-9, 2017
59. Targher G, Bertolini L, Padovani R et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*;29(6):1325–30, 2006

60. Caserta CA, Pendino GM, Amante A, et al. Cardiovascular risk factors, nonalcoholic fatty liver disease, and carotid artery intima-media thickness in an adolescent population in southern Italy. *Am J Epidemiol.* 171:1195–202, 2010
61. Lamotte C, Iliescu C, Libersa C, et al. Increased intima-media thickness of the carotid artery in childhood: a systematic review of observational studies. *Eur J Pediatr.* 170:719–29, 2011;
62. Bonci E, Chiesa C, Versacci P, et al. Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Subclinical Cardiovascular Changes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* :213737, 2015;
63. Lu H, Liu H, Hu F , et al. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Endocrinology*; 124958, 2013
64. Ma J, Hwang SJ, Pedley A, et al. Bidirectional relationship between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *J Hepatol.* pii: S0168-8278(16)30562-1, 2016
65. Pacifico L, Cantisani V, Ricci P, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and carotid atherosclerosis in children. *Pediatr Res*;63:423-7, 2008
66. Koot BG, de Groot E, van der Baan-Slootweg OH et al. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk in children with obesity. *Obesity (Silver Spring).* ;23(6):1239-43, 2015
67. Temple JL, Cordero P, Li J, et al. A Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence. *Int J Mol Sci.*;17(6).pii: E947, 2016
68. G. Boden. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity.*18(2);139-43, 2011
69. Di Sessa A, Umamo GR, Miraglia Del Giudice E, et al. From the liver to the heart: Cardiac dysfunction in obese children with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.*;9(2):69-73, 2017
70. Chacko KR, Reinus J. Extrahepatic Complications of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis.*;20(2):387-401, 2016
71. Selvakumar PKC, Kabbany MN, Nobili V, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Hepatic and Extrahepatic Complications. *Pediatr Clin North Am.*;64(3):659-675, 2017
72. VanWagner LB, Rinella ME. Extrahepatic Manifestations of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Hepatol Rep.* 15(2):75-85, 2016;
73. Kerkar N, D'Urso C, Van Nostrand K, et al.. Psychosocial outcomes for children with nonalcoholic fatty liver disease over time and compared with obese controls. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 56(1):77-82, 2013;
74. ICD-10 Version: 2016 <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en>. (Accesat 9 iunie 2017)
75. WHO STEPS surveillance manual : the WHO STEPwise approach to chronic disease risk factor surveillance / Noncommunicable Diseases and Mental Health, World Health Organization » (<http://apps.who.int/iris/handle/10665/43376> (accesat 9 iunie 2017)
76. Center for Disease Control ([https://www.cdc.gov/charts/cdc\\_charts.htm](https://www.cdc.gov/charts/cdc_charts.htm)) - accesat 9 iunie 2017
77. « The Children's Hospital of Philadelphia » (<https://zscore.research.chop.edu/index.php>) - accesat in 9 iunie 2017

78. Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, et al. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr.*;145(4):439-44, 2004
79. Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr.* ;34(11):2540-5, 1981
80. Kim-Dorner SJ, Deuster PA, Zeno SA, et al. Should triglycerides and the triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol ratio be used as surrogates for insulin resistance? *Metabolism.* ;59(2):299-304, 2010
81. <https://www.mdcalc.com/ast-platelet-ratio-index-apri> - accesat in 9 iunie 2017
82. <https://www.mdcalc.com/fibrosis-4-fib-4-index-liver-fibrosis> -accesat in 9 iunie 2017
83. **Lădaru A**, Bălănescu P, Stan M, et al. Candidate proteomic biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease (steatosis and non-alcoholic steatohepatitis) discovered with mass-spectrometry: a systematic review. *Biomarkers.*;21(2):102-14, 2016.
84. Mischak H, Allmaier G, Apweiler R, et al. Recommendations for biomarker identification and qualification in clinical proteomics. *Sci Transl Med* 2(46):46ps42, 2010
85. Bell LN, Saxena R, Mattar SG, et al. . Utility of formalin-fixed, paraffin-embedded liver biopsy specimens for global proteomic analysis in nonalcoholic steatohepatitis. *Proteomics Clin Appl* 5(7-8):397-404, 2011.
86. Sarsby J, Martin NJ, Lalor PF, Bunch J, Cooper HJ. Top-down and bottom-up identification of proteins by liquid extraction surface analysis mass spectrometry of healthy and diseased human liver tissue. *J Am Soc Mass Spectrom* 25(11): 1953-61, 2014
87. Uchida K, Suzuki H, Meno K, et al. Liver proteome expression profile in diabetic obese subjects. *Hepatol Int* 5(1):17, 2011
88. Charlton M, Viker K, Krishnan A, et al. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: New insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49(4):1375-84, 2009
89. Aqel, B, Langlais P, Vargas HE, et al. Prospective assessment of the abundance of drug metabolizing enzymes in the p450 pathway in patients with non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Hepatology* 60:759A, 2014
90. Su W, Wang Y, Jia X, et al. Comparative proteomic study reveals 17(beta)-hsd13 as a pathogenic protein in nonalcoholic fatty liver disease. *PNAS*, 111(31), 11437-42, 2014
91. Michail S, Frey MR, Fanter R, Wai D, Cleary JG, Hilbush B. Altered gut microbial energy and metabolism in children with non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 144(5):S30, 2013
92. Rodriguez-Suarez E, Duce AM, Caballeria J, et al. (2010). Non-alcoholic fatty liver disease proteomics. *Proteomics Clin Appl* 4(4): 362-371, 2010
93. Balanescu P, **Ladaru A**, Balanescu E, Baicus C, Dan GA. Systemic sclerosis biomarkers discovered using mass-spectrometry-based proteomics: A systematic review. *Biomarkers*, 19(5):345-355, 2014
94. Yu C, Xu C, Xu L, Yu J, Miao M, Li Y. Serum proteomic analysis revealed diagnostic value of hemoglobin for nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 56(1):241-7, 2012
95. Choe YG, Jin W, Cho YK, et al. Apolipoprotein B/AI ratio is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease in nondiabetic subjects. *J Gastroenterol Hepatol* 28(4):678-83, 2013

96. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, et al. Diagnostic value of biochemical markers (NASHtest) for the prediction of non alcoholic steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 6:34, 2006
97. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with nafld. *Hepatology* 45(4):846-54, 2007
98. Kim MK, Baek KH, Song KH et al. Increased serum ferritin predicts the development of hypertension among middle-aged men. *Am J Hypertens*. Apr;25(4):492-7, 2012
99. Amacher DE . Progress in the search for circulating biomarkers of nonalcoholic fatty liver disease. *Biomarkers* 19(7):541-52, 2014
100. Huang SC, Yang YJ. Serum retinol-binding protein 4 is independently associated with pediatric nafld and fasting triglyceride level. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 56(2):145-50, 2013
101. Samy W, Hassanian MA. Paraoxonase-1 activity, malondialdehyde and glutathione peroxidase in non-alcoholic fatty liver disease and the effect of atorvastatin. *Arab J Gastroenterol* 12(2): 80-5, 2011
102. Hoque M, Rentero C, Cairns R, et al. Annexins - scaffolds modulating pkc localization and signaling. *Cell Signal* 26(6):1213-25, 2014
103. van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, et al. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 1783(6): 953-6, 2008.
104. Lackner C. Hepatocellular ballooning in nonalcoholic steatohepatitis: The pathologist's perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 5(2):223-31, 2011
105. World health organisation. Global strategy on diet, physical activity and health. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/> accesat in 27.09. 2017
106. Farag Y.M., Gaballa Mr. Diabetesity: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant.* ;26(1):28-35, 2011
107. Di Bonito P, Valerio G, Grugni G, Licenziati Mr, Maffeis C, Manco M Et Al. CARDiometabolic risk factors in overweight and obese children in ITALY (CARITALY) Study Group. Comparison of non-HDL-cholesterol versus triglycerides-to-HDL-cholesterol ratio in relation to cardiometabolic risk factors and preclinical organ damage in overweight/obese children: the CARITALY study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*;25(5):489-94, 2015
108. Virani Ss. Non-HDL Cholesterol as a Metric of Good Quality of Care: Opportunities and Challenges. Coulter SA, ed. *Texas Heart Institute Journal.*;38(2):160-162, 2011
109. Oliveira, A., Oliveira, A. , Oliveira, N. , Oliveira, A. , Almeida, M. , Veneza Et Al. Is triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio a surrogates for insulin resistance in youth?. *Health.*;5, 481-485, 2013
110. **Bălănescu A.**, Bălănescu P., Comănici V. et al. Lipid profile pattern in pediatric overweight population with or without NAFLD in relation to IDF criteria for metabolic syndrome: a preliminary study. *Rom j Intern Med*, 56(1):47-54, 2018
111. Fernández Jr, Redden Dt, Pietrobelli A, Allison Db. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr.*;145(4):439-44, 2004

112. Atabek Me, Selver Eklioglu B, Akyürek N. Which metabolic syndrome criteria best predict non-alcoholic fatty liver disease in children? *Eat Weight Disord.* 19(4):495-501, 2014;
113. Weiss R, Otvos Jd, Sinnreich R, Miserez Ar, Kark Jd. The triglyceride to high-density lipoprotein-cholesterol ratio in adolescence and subsequent weight gain predict nuclear magnetic resonance-measured lipoprotein subclasses in adulthood. *J Pediatr.*;158(1):44-50, 2011
114. Sullivan Js, Le Mt, Pan Z, Rivard C, Love-Osborne K, Robbins K. et al. Oral Fructose Absorption in Obese Children with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Pediatric obesity.*;10(3):188-195, 2015
115. Song P, Yu J, Wang M, Chang X, Wang J, An L. Prevalence and Correlates of Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Chinese Children. *Int J Environ Res Public Health.*;27;14(5), 2017
116. Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E. Et Al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology.*;56(3):943-51, 2012
117. Calcaterra V, Klersy C, Muratori T et al. Prevalence of metabolic syndrome (MS) in children and adolescents with varying degrees of obesity. *Clin Endocrinol (Oxf).* Jun;68(6):868-72, 2008
118. Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M et al. Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem.*;233(1):1-8, 1995
119. Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely et al. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.*;562(1-3):11-5, 2004
120. Jerome, V., Leger, J., Devin, J. et al. Growth factors acting via tyrosine kinase receptors induce HSP90 alpha gene expression. *Growth Factors*; 4: 317-327, 1991
121. Zaldivar MM<sup>1</sup>, Pauels K, von Hundelshausen P, Berres ML, Schmitz P, Bornemann J, Kowalska MA, Gassler N, Streetz KL, Weiskirchen R, Trautwein C, Weber C, Wasmuth HE. CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis. *Hepatology.* Apr;51(4):1345-53, 2010
122. Slungaard A. Platelet factor 4: a chemokine enigma. *Int J Biochem Cell Biol.* Jun;37(6):1162-7, 2005
123. Mohsen M. M., Wesam A. I. , Shereen A. S. et al. Cytokeratin 18 as a non invasive marker in diagnosis of NASH and its usefulness in correlation with disease severity in Egyptian patients . *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 16, 41–46 , 2015
124. Tada T, Kumada T, Toyoda H et al. New scoring system combining the FIB-4 index and cytokeratin-18 fragments for predicting steatohepatitis and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Biomarkers.*;23(4):328-334, 2018
125. Nuño-Lámbarki N, Barbero-Becerra VJ, Uribe M et al. Mitochondrial Molecular Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Proteomics Approach. *Int J Mol Sci.* Mar 15;17(3):281, 2016
126. Charlton M, Viker K, Krishnan A, et al. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* Apr;49(4):1375-84, 2009

127. Wight TN. A role for proteoglycans in vascular disease. *Matrix Biol.* pii: S0945-053X(18)30037-4, 2018
128. Khadir A, Kavalakatt S, Cherian P, et al. Physical Exercise Enhanced Heat Shock Protein 60 Expression and Attenuated Inflammation in the Adipose Tissue of Human Diabetic Obese. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 6;9:16, 2018
129. Habich C, Sell H. Heat shock proteins in obesity: links to cardiovascular disease. *Horm Mol Biol Clin Investig.*;21(2):117-24 , 2015
130. Li XS, Xu Q, Fu XY, Luo WS. Heat shock protein 60 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer. *PLoS One*. 10;9(9):e107507, 2014
131. Xu Q<sup>1</sup>, Schett G, Perschinka H, Mayr M, et al. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population *Circulation*. 4;102(1):14-20, 2000
132. Miller MH, Walsh SV, Atrih A, et al. The serum proteome of nonalcoholic fatty liver disease: A multimodal approach to discovery of biomarkers of nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 29(10), 1839-47, 2014
133. Miller M, Ferguson M, Dillon JF. ITRAQ technology for the discovery of biomarkers in human NAFLD. *Hepatology* 50: 1187A, 2009
134. Miller M, Jafferbhoy H, Crowther D, Walsh S, Ferguson MA, Dillon JF. Novel non-invasive scoring system for the detection of nash from a nafld population. *Hepatology* 54:1113A, 2011
135. Trak-Smayra V, Dargere D, Noun R, et al. Serum proteomic profiling of obese patients: Correlation with liver pathology and evolution after bariatric surgery. *Gut* 58(6):825-832, 2009
136. Ulukaya E, Yilmaz Y, Moshkovskii S, et al. Proteomic analysis of serum in patients with non-alcoholic steatohepatitis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Scand J Gastroenterol*, 44(12), 1471-1476, 2009
137. Xin YN, Geng N, Lin ZH, Cui YZ, Duan HP, Zhang M, Xuan SY. Serum complement c3f and fibrinopeptide a are potential novel diagnostic biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease: A study in qingdao twins. *PLoS One* 9(9):e108132, 2014
138. Theodorakis JL, Vuppalanchi R, You J, et al. Mass spectrometry-based serum proteomics approach to biomarker discovery for non-invasive diagnostics of non-alcoholic steatohepatitis (nash). *Gastroenterology* 136(5):A845-46, 2009
139. Gaens KHJ, Niessen PMG, Rensen SS, et al. (2011). Increased endogenous formation of n(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in fatty liver induces inflammatory markers in an in vitro model of hepatic steatosis. *Diabetologia* 54: S286, 2011
140. Gaens KHJ., Niessen PMG., Rensen SS, et al. Endogenous formation of n(epsilon)-(carboxymethyl)lysine is increased in fatty livers and induces inflammatory markers in an in vitro model of hepatic steatosis. *Journal of Hepatology* 56(3):647-55, 2012.
141. Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, et al. D. . A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 42(3):665-74, 2005
142. Cardellini M, Gentileschi P, Davato F, et al. Molecular basis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese patients with or without glucose intolerance. *Diabetologia* 54:S285, 2011

143. Valle A, Catalan V, Rodriguez, A, et al. Identification of liver proteins altered by type 2 diabetes mellitus in obese subjects. *Liver Int*, 32(6), 951-61, 2012a
144. Valle A, Catalan V, Rodriguez A, et al. Liver proteome expression profile in diabetic obese subjects. *FEBS Journal* 279:212, 2012b
145. Gray J, Chattopadhyay D, Beale GS, et al. A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease. *BMC Cancer* 9:271, 2009
146. Lindner SA, Flint MS, Stewart NA, et al. Proteomic analysis of recurrent nonalcoholic steatohepatitis in liver transplantation. *Hepatology* 54:692A, 2011

## **LISTĂ PUBLICAȚII ANCA LĂDARU (CĂȘ. BĂLĂNESCU) ELABORATE ÎN CADRUL CERCETĂRILOR DOCTORALE**

ARTICOL ISI CU FACTOR DE IMPACT 2.006 IN ANUL PUBLICĂRII (2016)

1. **Candidate proteomic biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease (steatosis and non-alcoholic steatohepatitis) discovered with mass-spectrometry: a systematic review – Anca Lădaru, Paul Bălănescu, Mihaela Stan, Ioana Codreanu, Ioana Alina Anca, Biomarkers. 2016**  
**21(2): 102-14 DOI10.3109/1354750X.2015.1118542 (IF 2.006) -**  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1354750X.2015.1118542>

ARTICOL BDI INDEXAT PUBMED

2. **Lipid profile pattern in pediatric overweight population with or without NAFLD in relation to IDF criteria for metabolic syndrome: a preliminary study. - Bălănescu A, Bălănescu P, Comanici V, Stan I, Acs B, Prisăcariu L, Brezan F, Ciomârtan T, Gherghina I. Rom J Intern Med. 2018, 56,1, 47-54 DOI: 10.1515/rjim-2017-0040-**  
<https://content.sciendo.com/view/journals/rjim/56/1/article-p47.xml>



## PREZENTARI ORALE SIMPOZIOANE/ CONGRESE/ CONFERINȚE

3. **Screening ul pentru NAFLD în cadrul populației pediatrice obeze - Dr. Anca Bălănescu** (prezentat in data de 15 noiembrie 2017 in cadrul Conferintei “Monitorizarea în pediatrie –între teorie și practică ediția a II a”, INSMC ALESSANDRESCU RUSESCU”
4. **Importanța unui biomarker rar folosit în pediatrie pentru o boală comună – Anca Bălănescu.** (Workshop “Bolile rare în pediatrie” – 27.02.2018, INSMC “Alessandrescu-Rusescu”, Sala Amfiteatru)
5. **Screening-ul pentru NAFLD în cadrul populației pediatrice obeze – Dr Anca Bălănescu,** prezentare orală în cadrul Zilelor Medicale Vâlcele 2018, Ediția aXII-a, 21 septembrie 2018, Teatrul Anton Pann, Râmnicu Vâlcea.

## COAUTOR CAPITOLE DE CARTE

1. **Coautor** a 2 capitole de carte in “**Curs de pediatrie pentru studenți**”, **autor coordonator Doina Anca Pleșca, Editura Universitară “Carol Davila”, 2017** (ISBN 978 – 973 – 708 – 952 – 6) - Am colaborat la redactarea :
  - “**Semne și simptome frecvent întâlnite în pediatrie**” – Tatiana Ciomârțan, **Anca Bălănescu**; Capitolul 1 – Semiologie pediatrică, Volumul 1, pag.2- 13.
  - “**Sindroamele de imunodeficiență**” – Alexis Cochino, Anca Bălănescu, Sigrid Covaci; Capitolul 12 – Boli inflamatorii și sindroame de imunodeficiență, Volumul 2, pag. 438- 447.