



УДК 616.36-003.826.007.42-092.9:616-073.97

П. М. Боднар, О. Б. Динник, Г. П. Михальчишин, Т. В. Берегова,
Н. М. Кобиляк, Т. М. Фалалєєва, М. М. Кондро

Діагностична ефективність нового ультразвукового методу оцінки жорсткості печінки — еластографії хвилі зсуву у тварин з експериментальним ожирінням

(Представлено членом-кореспондентом НАН України І. С. Чекманом)

Досліджено зміни жорсткості печінки (ЖП) на лабораторних тваринах з експериментальним ожирінням. У тварин з глютаматіндукованим ожирінням (ГІО) виявлено статистично достовірне збільшення ЖП на 63,6%, а з дієтіндукованим (ДІО) — на 52,2% порівняно з інтактними щурами ($p < 0,001$). Морфологічно у 93,3% тварин з ожирінням констатовано неалкогольний стеатогепатоз. Для ЖП за даними еластографії хвилі зсуву констатовано відмінну якість діагностичної моделі, оскільки AUROC у тварин з ГІО становила 0,983, а у тварин з ДІО — 0,994. Порогове значення ЖП, при якому діагностувався жиривий гепатоз, становило $>6,25$ та $>6,1$ кПа. Чутливість, специфічність, PPV та NPV для заданого показника становили відповідно 86,6, 100, 100 і 93,7% у тварин з ГІО та 93,3, 100, 100 і 96,7% у щурів із ДІО.

Для визначення жорсткості печінки (ЖП) метод еластографії є найбільш перспективним. Виділяють соноеластографію та магнітно-резонансну еластографію (МРЕ).

МРЕ — єдиний метод, який оцінює ЖП в цілому як органа і може визначати топографію розподілу патологічно зміненої тканини та її відсоток щодо маси всього органа. Недоліком методу вважається його дорожнеча і складність виконання, проте в міру здешевлення МР-томографів і їх більш широкого розповсюдження МРЕ цілком може стати еталонним серед фізичних методів оцінки ЖП.

В основі соноеластографії лежить вимірювання руху тканин під дією навантаження з подальшою реконструкцією просторового розподілу модуля жорсткості зсуву. В одному з перших запропонованих еластографічних методів механічне навантаження є зовнішнім і створюється за допомогою м'якого натиснення на тканини стандартним УЗ датчиком. Тиск деформації по суті є статичним і тому даний метод називається статичною або компресійною УЗ еластографією [1]. Однак вона має ряд обмежень: дає змогу проводити обстеження тільки поверхнево розташованих структур, не стандартизована і тому суб'єктивна

© П. М. Боднар, О. Б. Динник, Г. П. Михальчишин, Т. В. Берегова, Н. М. Кобиляк, Т. М. Фалалєєва,
М. М. Кондро, 2013

в оцінці. Основним недоліком є неможливість проведення кількісної оцінки жорсткості тканин.

При транзиторній еластографії (ТЕ) зовнішнє навантаження є динамічним, вібрації звукової частоти в тканинах створюються під дією зовнішніх вібраторів [2]. ТЕ показує хороші результати для виявлення вираженого фіброзу (F3) і цирозу печінки (F4) у хворих з хронічним вірусним гепатитом С [3], гепатитом В [4], алкогольною хворобою печінки [5] та неалкогольною жировою хворобою печінки (НАЖХП) [6].

Обмеженнями ТЕ є: асцит (хвилі зсуву не поширюються в рідині), вузькі міжреберні проміжки (неможливо вставити зонд у міжребер'я), абдомінальне ожиріння. При вираженому абдомінальному ожирінні ($IMT > 28 \text{ кг/м}^2$) ймовірність технічної помилки збільшується в 9 разів [7]. При IMT вище 40 кг/м^2 невдача при виконанні ТЕ зростає до 88% [8].

Оскільки ділянка печінки, яка досліджується при УЗ ТЕ, являє собою циліндр розміром $1 \times 4 \text{ см}$ (приблизно $1/100$ всієї паренхіми печінки), глибиною 25–65 мм від поверхні шкіри і обмежується краєм правої частки печінки, існує ризик отримати похибку вибірки.

На сьогодні найбільш перспективними є методи, в яких навантаження і деформації створюються локально, тобто безпосередньо в середині тканини. В даний час в межах методу інтенсивно розробляються вже кілька істотно різних модифікацій. В одній із них візуалізація жорсткості зсуву тканин заснована на визначенні швидкості поширення хвиль зсуву, джерелом яких є імпульсна сила радіаційного тиску в фокальній області, яка дозволяє врахувати модуль Юнга за величиною виміряної швидкості. Дана ідея отримала назву “візуалізація жорсткості за допомогою хвиль зсуву” (Shear Wave Elasticity Imaging, (SWEI)).

Еластографія хвилі зсуву (ЕХЗ) проводиться сумісно з рутинним УЗ дослідженням В-методом у реальному масштабі часу, що дає можливість виконувати візуальну навігацію зони інтересу еластографії будь-яких сегментів печінки. ЕХЗ як фізичний принцип не потребує додаткового акустичного чи вібраційного впливу на досліджувані тканини. ЕХЗ є двовимірною методикою і надає інформацію з зони інтересу як у якісному вигляді (одновимірне кольорове картування за каліброваною шкалою), так і кількісному вигляді (значення жорсткості тканин у кПа каліброваної шкали).

Ми використали ЕХЗ для оцінки ефективності даного методу в діагностиці неалкогольного стеатогепатозу у тварин з експериментальним ожирінням. Наше дослідження є пріоритетним.

Матеріали та методи. Моделювання експериментального ожиріння проводили на 40 статевозрілих щурах. Тварини були поділені на три групи: I — інтактний контроль ($n = 10$); II — тварини з ожирінням, індукованим дієтою з високим вмістом жирів ($n = 15$); III — тварини з ожирінням, індукованим підшкірним введенням глутамату натрію в неонатальний період ($n = 15$).

Протягом першого тижня щурам I та II груп давали стандартний корм “Purina rodent chow” (жир — 20,6%, білок — 32,4%, вуглеводи — 47%) і воду *ad libitum*. Потім тваринам контрольної групи протягом 12 тижнів давали стандартний корм і воду *ad libitum*, а тварини II групи протягом 12 тижнів перебували на дієті з підвищеним вмістом жирів та вуглеводів, що складається зі стандартного корму (47%), солодкого згущеного молока (44%), рослинної олії (8%) і рослинного крохмалю (1%) (жир — 29,6%, білок — 14,8%, вуглеводи — 55,6%), і отримували воду *ad libitum*. Новонародженим щурам III групи підшкірно в об'ємі 8 мкл/г вводили глутамат натрію (4 мг/г, 2,5 М) на 2-гу, 4-ту, 6-ту, 8-му, 10-ту добу життя. При проведенні експерименту щодня спостерігали за загальним станом тварин, споживанням корму та води, один раз на тиждень визначали масу тіла.

Через 3 місяці у щурів усіх груп було проведено аналіз змін маси тіла. За добу до початку експерименту тварини не отримували їжі, але мали вільний доступ до води.

Всім тваринам натще під внутрішньочеревним уретановим наркозом транскутанно проводили вимірювання ЖП за допомогою EX3 на УЗ апараті Ultima PA (“Радмир”, Україна) лінійним датчиком 10–5 МГц. При чому кількість успішних вимірювань повинна була становити не менше 10. Після цього визначали медіану, яка характеризувала ЖП в кілопаскалях (кПа), розраховували показник інтерквартильного розмаху (IQR), що характеризує однорідність одержуваних даних і є інтервалом з центром в точці медіани, в який вкладаються результати 50% вимірів (від 25-го до 75-го квартильного значення). При цьому однорідним результат вимірювання вважався в тому випадку, якщо співвідношення IQR/медіана становило менше 30%. Для аналізу внутрішньодослідницької узгодженості проводили порівняння результатів першої та другої серій з п’яти вимірювань, отриманих одним і тим же дослідником, з розрахунком коефіцієнта внутрішньокласової кореляції (КВК).

Після декапітації в тварин забирали кров для біохімічного дослідження та відбирали зразки тканини з правої і лівої частки печінки (розмір шматочків тканини печінки становив $0,5 \times 0,5$ см) для морфологічного дослідження.

Для оцінки функціонального стану печінки досліджували рівень сироваткових АЛТ, АСТ, загального, непрямого та прямого білірубіну, визначали співвідношення АСТ/АЛТ. Екстракцію ліпідів проводили за методом Фолча.

Для оцінки морфологічних змін у тварин з експериментальним ожирінням використовували гістологічну шкалу NAS (NAFLD activity score) [9]. Система оцінки включає 14 гістологічних ознак, 4 з яких є напівкількісними і оцінюються в балах — стеатоз (0–3), лобулярне запалення (0–3), балонна дистрофія (0–2) і фіброз (0–4). Інші 9 ознак описуються як наявні чи відсутні. Сума балів ≤ 3 свідчить про наявність стеатогепатозу, що дає підставу виключити неалкогольний стеатогепатит (НАСГ), а ≥ 5 свідчить про його наявність.

Статистичний аналіз виконували за допомогою стандартного пакета програм SPSS версії 20.0 та Microsoft Excel. Кількісні зміни наведено у вигляді середньої величини та стандартного відхилення середньої величини ($M \pm SD$). ЖП подано графічно у вигляді коробчатої діаграми. Верхній та нижній сторони діаграми відповідають 25-й та 75-й квартилі, а лінія, що проходить через середину квадрата, відповідає значенню медіани (Me). Для оцінки відмінності кількісних показників використовували *t*-критерій Стьюдента. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при $p < 0,05$. Кореляційну взаємодію між кількісними змінними розраховували з використанням коефіцієнта Пірсона.

Для оцінки діагностичної ефективності EX3 застосовували ROC-аналіз, розраховуючи площу під ROC-кривою (AUROC), за значенням якої визначали якість діагностичної моделі. Використовуючи оптимальні порогові значення для діагностики стеатогепатозу, розраховували чутливість, специфічність, позитивну (PPV) та негативну (NPV) прогностичну цінність. Оптимальні порогові значення були вибрані для максимальної суми чутливості і специфічності при ROC-аналізі.

Результати та їх обговорення. Маса тіла лабораторних тварин була достовірно нижчою в контрольній групі, ніж у щурів з ожирінням ($p < 0,001$). У тварин з глютаматіндукованим ожирінням (ГІО) маса тіла була вищою на 32,7%, а з діетіндукованим ожирінням (ДІО) — на 25,8% порівняно з інтактними щурами, середня маса яких становила $248,7 \pm 5,73$ г. Ми спостерігали статистично достовірну вищу масу тіла у тварин з ГІО порівняно з таким у тварин із ДІО ($p = 0,018$). Середня маса тіла у щурів з ГІО становила $329,0 \pm 16,99$ г, а з ДІО — $312,9 \pm 18,09$ г.

Як видно із табл. 1, статистично достовірної різниці між рівнями трансаміназ та показниками пігментного обміну печінки у інтактних щурів та тварин з ожирінням не встановлено.

За нашими даними, концентрація загальних ліпідів та тригліцеридів (ТГ) у печінці щурів з ожирінням була статистично достовірно вищою. У щурів з ГІО відмічено збільшення вмісту загальних ліпідів у паренхімі органа на 20,8% ($p < 0,001$) та ТГ на 22,67% ($p < 0,001$), а у щурів з ДІО — відповідно на 14,95% ($p = 0,017$) і 23,75% ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою. У тварин з різними моделями ожиріння статистично достовірної різниці між концентраціями загальних ліпідів ($p = 0,088$) та ТГ ($p = 0,783$) в печінці не виявлено. Проте у тварин з ДІО була вищою частка ТГ в загальному пулі ліпідів — 40,9% проти 38,6% у щурів з ГІО.

Діагностична доступність методу ЕХЗ визначалася на основі відношення числа тварин, у яких вдалося провести дослідження з виконанням 10 вимірювань і зі значенням співвідношення IQR/медіана $\leq 30\%$ до загальної кількості експериментальних щурів. Усім лабораторним тваринам вдалося провести 10 вимірювань ЖП, проте в одній тварині контрольної групи (10%) та в одній з ДІО (6,7%) значення IQR/медіана перевищувало 30%, що свідчить про неоднорідність отриманих результатів і дані яких не включались в подальше дослідження. Таким чином, доступність методу ЕХЗ у лабораторних тварин контрольної групи становила 90%, а у щурів з ГІО та ДІО — 100 і 93% відповідно.

При аналізі відтворюваності методу ЕХЗ нами констатовано відмінну внутрішньодослідницьку узгодженість результатів, оскільки КВК у контрольній групі тварин становив 0,861 (95% ДІ 0,636–0,951), у щурів з ГІО та ДІО — 0,924 (95% ДІ 0,780–0,975) і 0,859 (95% ДІ 0,584–0,957) відповідно. При використанні двобічного порівняння КВК у різних групах статистично достовірної різниці не виявлено.

Проведені вимірювання показали, що медіана, 25-й та 75-й квартиль для ЖП в лабораторних тварин були такими: у інтактних — 4,4 кПа (4,1–4,9), у щурів з ГІО — 7,2 кПа (6,6–7,7), у щурів з ДІО — 6,7 кПа (6,5–7,1) (рис. 1). Ми довели статистично достовірне збільшення ЖП на 63,6% у тварин з ГІО та на 52,2% у тварин з ДІО порівняно з інтактними щурами ($p < 0,001$). Достовірної різниці між значенням ЖП у тварин з експериментальним ожирінням не виявлено ($p = 0,168$). На нашу думку, зростання ЖП у тварин з експериментальним ожирінням порівняно з інтактними щурами обумовлено розвитком у даних тварин

Таблиця 1. Показники функціонального стану печінки та кількість ліпідів в паренхімі печінки у лабораторних тварин, $M \pm SD$

Показник	Інтактні тварини ($n = 10$)	Тварини з ГІО ($n = 15$)	p_1	Тварини з ДІО ($n = 15$)	p_2
АЛТ, мккат/л	0,240 \pm 0,042	0,211 \pm 0,031	0,066	0,217 \pm 0,025	0,107
АСТ, мккат/л	0,393 \pm 0,039	0,377 \pm 0,041	0,379	0,393 \pm 0,038	0,984
Загальні ліпіди, мг/г сирової печінки	16,92 \pm 2,49	20,44 \pm 1,69	<0,001	19,45 \pm 1,35	0,017
Тригліцериди, мг/г сирової печінки	6,44 \pm 0,45	7,90 \pm 0,76	<0,001	7,97 \pm 0,59	<0,001
Загальний білірубін, мкмоль/л	12,6 \pm 2,36	12,7 \pm 1,53	0,867	12,8 \pm 1,64	0,742
Непрямий білірубін, мкмоль/л	7,9 \pm 1,96	8,1 \pm 1,06	0,704	8,2 \pm 1,03	0,548
Прямий білірубін, мкмоль/л	4,7 \pm 0,82	4,6 \pm 0,93	0,783	4,6 \pm 0,91	0,783

Примітка. Оцінка вірогідності різниці між досліджуваними групами розрахована з використанням t -критерію Стьюдента. p_1 — оцінка вірогідності між тваринами з ГІО та контролем, p_2 — між тваринами з ДІО та контролем. Вірогідною вважалася різниця при значенні $p < 0,05$.

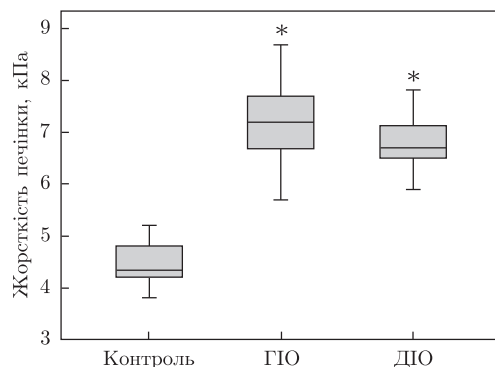


Рис. 1. Жорсткість печінки у лабораторних тварин. Дані подано у вигляді Ме (25–75). Верхній та нижній сторони коробчатої діаграми відповідають 25-й та 75-й квартилі, а лінія, що проходить через середину квадрата, — значенню медіани. Оцінка вірогідності різниці між досліджуваними групами розрахована з використанням *t*-критерію Стьюдента. * $p < 0,001$ між тваринами з ожирінням та інтактними щурами

НАЖХП. Оскільки поширеність НАЖХП при наявності ожиріння, за даними різних авторів, становить 70–100%.

Збільшення ЖП у тварин з експериментальним ожирінням асоційоване зі зростанням кількості загальних ліпідів та ТГ у паренхімі печінки. Ми виявили прямий статистично достовірний середній кореляційний зв'язок між ЖП та концентрацією загальних ліпідів у тварин з ГІО ($r = 0,528$, $p = 0,043$) і ДІО ($r = 0,607$, $p = 0,016$). Пряму статистично достовірну середню кореляційну взаємодію виявили також між вмістом ТГ в печінці та ЖП, проте, навпаки, у тварин з ГІО ($r = 0,699$, $p = 0,004$) вона була вираженішою порівняно з такою у щурів із ДІО ($r = 0,595$, $p = 0,019$).

Для оцінки морфологічних змін у печінці лабораторних тварин використовували шкалу NAS. У тварин з ГІО та ДІО загальна кількість балів, отриманих за шкалою, становила $2,33 \pm 0,81$ та $2,33 \pm 0,9$ відповідно. Згідно з даною шкалою сума балів ≤ 3 дає підставу виключити НАСГ та констатувати стеатогепатоз. За нашими даними, ≤ 3 балів виявлено у 93,3% тварин у кожній групі з експериментальним ожирінням. У всіх тварин спостерігалися ознаки жирової дистрофії за типом великокраплинного стеатозу. У тварин з ГІО легкий стеатоз (накопичення ліпідів у паренхімі 5–33%) виявлено у 53,3% особин, а середнього ступеня (накопичення ліпідів в паренхімі 33–66%) у 46,7. У щурів з ДІО важкий стеатогепатоз (накопичення ліпідів у паренхімі $\geq 66\%$) діагностовано у 6,6% особин, а легкий та середній — в 46,7 та 46,7% відповідно. В 60% тварин з ГІО та 53,3% з ДІО виявлено м'яке лобулярне запалення (1 бал за шкалою NAS — < 2 вогнищ у полі зору при збільшенні $\times 200$) ($p = 0,765$). У 13,3% тварин з ГІО та 6,7% з ДІО встановлено балонну дистрофію ($p = 0,559$). У 6,7% тварин кожної групи з експериментальним ожирінням спостерігали пограничний стан — сума балів за шкалою NAS становила 4.

Для визначення діагностичної ефективності ЕХЗ методом SWEI використали ROC-аналіз. Нами констатовано відмінну якість діагностичної моделі у тварин з ГІО, оскільки AUROC для ЖП становила 0,983 (95% ДІ 0,955–0,999; $p < 0,001$) (рис. 2, табл. 2). Порогове значення ЖП, при якому діагностувався жировий гепатоз, становило $> 6,25$ кПа. Чутливість, специфічність, PPV та NPV для заданого показника дорівнювали 86,6, 100, 100 і 93,7% відповідно.

У тварин з ДІО встановлено покращення якості відповідного діагностичного тесту порівняно з тваринами з ГІО. Так, AUROC для ЖП зросла до 0,994 (95% ДІ 0,981–1,0; $p < 0,001$),

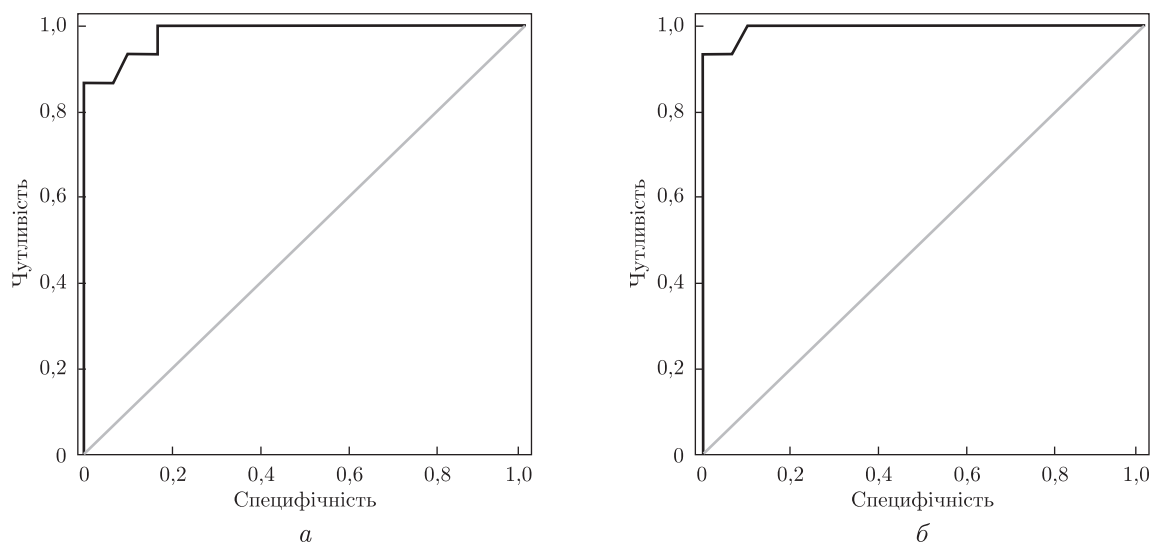


Рис. 2. ROC-криві, розраховані для жорсткості печінки за даними ЕХЗ у лабораторних тварин з експериментальним ожирінням: а – ГІО; б – ДІО

Таблиця 2. Діагностична цінність ЕХЗ методом SWEI для діагностики неалкогольного стеатогепатозу у лабораторних тварин з експериментальним ожирінням

Показник	ГІО	ДІО
Порогове значення	>6,25	>6,1
Чутливість, %	86,6	93,3
Специфічність, %	100	100
NPV, %	93,7	96,7
PPV, %	100	100
AUROC	0,983	0,994
95% ДІ	0,955–0,999	0,981–1,0
<i>P</i> (AUROC)	<0,001	<0,001

Примітка. NPV – негативна прогностична цінність, PPV – позитивна прогностична цінність, AUROC – площа під ROC-кривою, 95% ДІ – 95%-й довірчий інтервал для AUROC.

також підвищилась чутливість та NPV до 93,3 і 96,7% відповідно при розрахованому оптимальному пороговому значенні > 6,1 кПа.

Отже, збільшення ЖП, яке вимірюється за допомогою ЕХЗ методом SWEI, має високу діагностичну ефективність для виявлення неалкогольного стеатогепатозу і може використовуватись як неінвазивний діагностичний маркер даної патології.

1. Ophir J., Cespedes E. I., Ponnekanti H. et al. Elastography: a method for imaging the elasticity in biological tissues // *Ultrasound image*. – 1991. – **13**. – P. 111–134.
2. Parker K. J., Huang S. R., Musulin R. A., Lerner R. M. Tissue response to mechanical vibrations for “sonoelasticity imaging” // *Ultrasound Med. and Biol.* – 1990. – **16**, No 3. – P. 241–246.
3. Ziol M., Handra-Luca A., Kettaneh A. et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C // *Hepatology*. – 2005. – **41**. – P. 48–54.
4. Marcellin P., Ziol M., Bedossa P. et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B // *Liver Int.* – 2009. – **29**, No 2. – P. 242–247.
5. Nahon P., Kettaneh A., Tengher-Barna I. et al. Assessment of liver fibrosis using transient elastography in patients with alcoholic liver disease // *J. Hepatol.* – 2008. – **49**, No 6. – P. 1062–1068.
6. Wong V. W., Vergniol J., Wong G. L. et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease // *Hepatology*. – 2010. – **51**, No 2. – P. 454–462.

7. Foucher J., Castera L., Bernard P. H. et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations // Eur. J. Gastroenterol. & Hepatol. – 2006. – 18. – P. 411–412.
8. Roulot D., Czernichow S., LeClésiau H. et al. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome // J. Hepatol. – 2008. – 48, No 4. – P. 606–613.
9. Kleiner D. E., Brunt E. M., Van Natta M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis Clinical Research Network: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease // Hepatology. – 2005. – No 41. – P. 1313–1321.

Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ
ННЦ “Інститут біології” Київського
національного університету ім. Тараса Шевченка
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ
Львівський національний медичний університет
ім. Данила Галицького

Надійшло до редакції 01.11.2012

**П. Н. Боднар, О. Б. Дынник, Г. П. Михальчишин, Т. В. Береговая,
Н. Н. Кобыляк, Т. М. Фалалева, М. М. Кондро**

Диагностическая эффективность нового ультразвукового метода оценки жесткости печени — эластографии сдвиговой волны у животных с экспериментальным ожирением

Исследованы изменения жесткости печени (ЖП) на лабораторных животных с экспериментальным ожирением. У животных с глутаматиндуцированным ожирением (ГИО) выявлено статистически достоверное увеличение ЖП на 63,6%, а с диетиндуцированным (ДИО) — на 52,2% по сравнению с интактными крысами ($p < 0,001$). Морфологически у 93,3% животных с ожирением констатировано неалкогольный стеатогепатоз. Для ЖП по данным эластографии сдвиговой волны констатировано отличное качество диагностической модели, поскольку AUROC у животных с ГИО составила 0,983, а у животных с ДИО — 0,994. Пороговое значение ЖП, при котором диагностировался жировой гепатоз, составило $> 6,25$ и $> 6,1$ кПа. Чувствительность, специфичность, PPV и NPV для заданного показателя составили соответственно 86,6, 100, 100 и 93,7% для животных с ГИО и 93,3, 100, 100 и 96,7% у крыс с ДИО.

**P. M. Bodnar, O. B. Dynnyk, G. P. Mykhalchyshyn, T. V. Beregova,
N. M. Kobyliak, T. M. Falalyeyeva, M. M. Kondro**

Diagnostic efficacy of a new ultrasound method for assessing the liver stiffness — shear wave elastography in animals with experimental obesity

We have studied changes of the liver stiffness measured by SWE in animals with experimental obesity. We noted a significant increase of LS by 63.6% in rats with glutamate-induced obesity (GIO) and, respectively, by 52.2% in animals with diet-induced obesity (DIO) compared to intact rats ($p < 0.001$). Histologically confirmed non-alcoholic steatosis was diagnosed in 93.3% of animals with

obesity. The AUROC of SWE in animals with GIO and DIO was 0.983 and 0.994, respectively. The optimal LS cutoff points for the prediction of steatosis were >6.25 and >6.1 kPa, with sensitivity, specificity, PPV, and NPV equal to 86.6%, 100%, 100%, and 93.7%, respectively, for rats with GIO and 93.3, 100, 100, and 96.7% for rats with DIO.