

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
“ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ ІМЕНІ
АКДЕМІКА О. М. ЛУК'ЯНОВОЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ”
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
“ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ ІМЕНІ
АКДЕМІКА О. М. ЛУК'ЯНОВОЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ”

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

МИХАЙЛЮК ХРИСТИНА ЗЕНОВІЇВНА

УДК 616.36-002-053.2-036:615.356

ДИСЕРТАЦІЯ

**Удосконалення діагностики та оцінки клінічного перебігу автоімунного
гепатиту у дітей**

14.01.10 – педіатрія

Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Х.З. Михайлюк

Науковий керівник: Березенко Валентина Сергіївна, доктор медичних
наук, старший науковий співробітник

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Михайлюк Христина Зеновіївна. Удосконалення діагностики та оцінки клінічного перебігу автоімунного гепатиту у дітей. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.10 «Педіатрія». - ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України», Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена комплексному вивченню клініко-параклінічних особливостей перебігу АГ у дітей, оптимізації діагностики прогресуючого перебігу АГ шляхом дослідження впливу на перебіг хвороби забезпеченості організму вітаміном D, варіантів поліморфізму гена VDR та оцінки результатів еластографії зсувної хвилі паренхіми печінки в діагностиці фіброзу печінки у даного контингенту хворих. Було досліджено зв'язок забезпеченості вітаміном D дітей з АГ залежно від морфо-функціональних особливостей перебігу хвороби, особливості поліморфізму гену VDR (ApaI, BsmI, TagI), вивчено взаємозв'язок забезпеченості вітаміном D, та варіанту поліморфізму генів VDR (ApaI, BsmI, TagI) та стадії фіброзу печінки у дітей з АГ, на основі співставлення морфологічного, біохімічного та ультразвукового дослідження печінки методом еластографії зсувної хвилі в динаміці лікування запропоновано спосіб оцінки результатів еластографії зсувної хвилі у дітей з АГ до лікування та встановлено оптимальні терміни використання цього методу для оцінки фіброзу печінки у цих хворих. За результатами проведених досліджень встановлено предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей.

Встановлено, що АГ хворіють переважно дівчатка пре- та пубертатного віку, 68,0% проти 32,0% хлопців ($p < 0,05$). В родинях дітей з АГ достатньо високою була частота автоімунної патології, у 30,0 % дітей родичі першого порядку мали різноманітні автоімунні захворювання. У дітей переважає АГ І типу, який діагностовано у 80,0 %, в той час як діагностично значимий титр

anti-LKM-1, що характеризує АГ II типу встановлено лише у однієї дитини, серонегативний варіант АГ мали 12,0% дітей. Клінічна картина маніфестації хвороби неспецифічна і у більшості хворих подібна до гострого гепатиту та визначалась ступенем порушення функціонального стану печінки і була максимально представлена у хворих з високо та помірно активним перебігом АГ. Основними клінічними симптомами АГ є інтоксикаційний, гепатоспленомегалія та позапечінкові прояви, а біохімічними – імунно-запальний та синдром цитолізу. Синдром цитолізу, мав місце у 95,0 % обстежених. Мезенхімально-запальний синдром діагностовано у 83,0% обстежених та характеризувався переважно підвищенням рівня γ -глобулінів, тимолової проби та IgG. В 32,0% дітей з цирозом печінки, внаслідок АГ виявлено: порушення білково-синтетичної функції печінки. Ступінь гістологічної активності (Knodell) і біохімічна активність запального процесу в печінці, за нашими даними, не є тотожними, а суттєво доповнюють один одного, про що свідчить той факт, що у 19,0 % дітей з високою гістологічною активністю мало місце підвищення рівнів трансаміназ до 5 норм. За результатами морфологічного дослідження біоптату печінки встановлено, що в переважній більшості дітей, хворих на АГ, мав місце виразний фіброз печінки та початкові прояви цирозу (F3 та F4 за METAVIR) - 67,0% (n=30). Морфологічні ознаки цирозу мали 22,0% дітей. Помірну та високу гістологічну активність гепатиту 9-18 балів за Knodell діагностовано в 62,0% (n=28) пацієнтів.

68,0% дітей з АГ мають дефіцит вітаміну D, який не залежить від пори року та регіону проживання. Найнижчий рівень вітаміну D спостерігається у дівчат 10-18 та у хлопців 5-18 років, однак без достовірної відмінності. Найнижчий рівень концентрації 25(OH)D у сироватці крові спостерігався взимку та навесні. Частка дефіциту вітаміну D навесні у дітей з АГ становила 70,0%, восени 55,0%, влітку – 85,0% та взимку 75,0% ($p > 0,05$). Найнижчий рівень дефіциту в обстежених дітей був восени, і становив 55,0%, що підтверджує роль інсоляції в забезпеченості вітаміном D.

Аналіз забезпеченості вітаміном D залежно від біохімічної активності гепатиту показав, лише в період клініко-лабораторної ремісії рівень вітаміну D знаходився в зоні недостатності. Ми не виявили достовірної різниці в забезпеченості вітаміном D між групами дітей залежно від біохімічної активності АГ ($p > 0,05$).

Гістологічна активність та стадія фіброзу впливають на рівень 25(OH)D в сироватці крові. У хворих з ІГА < 9 балів частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 25,0% ($n=7$), а у пацієнтів з ІГА > 9 балів - 75,0% ($n=21$) ($\chi^2=5,1$; $p=0,023$).

Аналіз забезпеченості вітаміном D у хворих з різною стадією фіброзу за даними морфологічного дослідження показав, що у дітей з стадією фіброзу F2 за METAVIR частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 67%, з стадією фіброзу F3 - 75%, а у пацієнтів з цирозом печінки – 90% ($p > 0,05$).

У дітей з цирозом печінки (ЦП) – 32,0% – середній рівень вітаміну D складав 15,6[10–19,2]нг/мл. У жодної дитини цієї групи не було оптимального рівня вітаміну D, тоді як дефіцит склав 89,0%, недостатність - у 11,0%. Дефіцит вітаміну D достовірно частіше мав місце в групі дітей з проявами цирозу печінки ($p < 0,05$).

Аналіз взаємозв'язку між концентрацією 25(OH)D у сироватці крові та поліморфними варіантами гена VDR показав, що достовірної різниці в рівні забезпеченості вітаміном D залежно від досліджених генотипів виявлено не було, за виключенням алельного варіанту BsmI. У дітей з генотипом GA за поліморфним варіантом BsmI відмічалось достовірне зниження концентрації 25(OH)D в сироватці крові ($12,44 \pm 5,51$) порівняно з генотипами AA ($18,54 \pm 7,80$) та GG ($19,23 \pm 7,05$) ($p < 0,05$).

Діти із комбінацією генотипів AA/TC/AA, AC/TT/GG, CC/TT/GG достовірно частіше мали вищий рівень вітаміну D в сироватці крові порівняно із дітьми із комбінацією генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR ($p < 0,05$).

За нашими даними діти з стадіями фіброзу F3 та F4 достовірно частіше мали CC генотип за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR порівняно з дітьми з стадіями фіброзу F1-F2 ($\chi^2=3,953$; $p < 0,05$).

У дітей з АГ було виявлено наступні комбінації генотипів: AA/TC/AA (n=8), AA/CC/AA (n=8), AC/TT/GG (n=11), AC/TT/GA (n=1), AC/TC/GA (n=14), CC/TT/GG (n=9). Аналіз впливу комбінації за трьома алельними варіантами гена рецептора VDR (ApaI, TagI, BsmI) на 25(OH)D та виразність фіброзу печінки показав, що хворі із комбінацією генотипів AA/TC/AA, AC/TT/GG, CC/TT/GG достовірно частіше мали вищий рівень вітаміну D в сироватці крові порівняно із дітьми із комбінацією генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR ($p < 0,05$). Діти із комбінацією генотипів AA/CC/AA достовірно частіше мали фіброз F3 та F4 ($\chi^2=3,953$; $p < 0,05$).

Генотип CC за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR та комбінації генотипів AA/CC/AA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена були асоційовані із виразним фіброзом F3 та F4 METAVIR у дітей хворих на автоімунний гепатит. Діти з виразним фіброзом (F3 та F4 METAVIR) достовірно частіше мали CC генотип за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR ($p < 0,05$), та генотип AA/CC/AA за дослідженими алельними варіантами гена рецептора VDR ($p < 0,05$). Наявність C алелі за поліморфним варіантом TagI гена VDR збільшує ризик мати прогресуючу стадію фіброзу в 1,9 разів (OR=1,96; 95% CI 0,77-5,0; RR=1,56; 95% CI 0,81-3,0; Se 78%, Sp 34%).

Автоімунний гепатит у переважної більшості дітей 67,0% (n=30) характеризується виразним фіброзом >F2 за METAVIR. За результатами морфологічного дослідження у 62,0% дітей активність гепатиту (ІГА) була > 9 балів за Knodell, із них у 60,0% мав місце високоактивний запальний процес в печінці ІГА > 12 балів Knodell.

У 66,0% дітей стадія фіброзу отримана при гістологічному дослідженні співпадала з даними еластографії печінки. Порівняння результатів

гістологічного дослідження паренхіми печінки у хворих до початку імуносупресивної терапії та на фоні лікування підтверджують, що імуносупресивна терапія призводить до патоморфозу АГ - зниження гістологічної активності, мінімізації проявів, або повного зникнення гістологічних маркерів АГ, що свідчить про доцільність проведення діагностичної пункційної біопсії печінки у цих хворих до початку призначення патогенетичної терапії.

Застосування ультразвукової еластографія зсувної хвилі для оцінки стадії фіброзу у дітей з АГ в період розгорнутих клінічних проявів не є доцільним, оскільки активність гепатиту впливає на показники жорсткості паренхіми печінки. При нормалізації біохімічних показників має місце достовірне зниження показників жорсткості паренхіми печінки ($p < 0,05$).

Через 6 та 12 місяців лікування, практично в усіх дітей вдалося досягнути нормалізації біохімічних показників та зниження показників жорсткості паренхіми печінки ($p < 0,05$). Різниця показників жорсткості печінки до лікування та через 6 місяців лікування відображає вклад частки активності захворювання в показник жорсткості печінки. Визначено оптимальні терміни проведення еластографії зсувної хвилі для оцінки виразності фіброзу печінки у дітей з АГ.

Новизна роботи полягає в наступному. Вперше на основі комплексного обстеження дітей з АГ було встановлено взаємозв'язок ступеня забезпеченості вітаміном D цих хворих, з морфо-функціональними особливостями перебігу хвороби.

Встановлено, що у двох третин дітей з АГ, переважно з помірно- та високоактивним перебігом гепатиту та стадією фіброзу F3 за METAVIR, мав місце дефіцит вітаміну D, а також практично у всіх пацієнтів з цирозом печінки. Оптимальний рівень вітаміну D мали 33,0 % дітей з мінімальною активністю, в той час як при високій гістологічній активності гепатиту оптимальний рівень діагностовано лише в 6,0% випадків, а дефіцит - в 76,0% пацієнтів ($p < 0,05$). У дітей з стадією фіброзу F1 та F2 за METAVIR

оптимальний рівень вітаміну D діагностовано в 33,0% хворих відповідно, а з стадією фіброзу F3 лише у 10,0% дітей. Жоден хворий з цирозом печінки (стадія фіброзу F4) не мав оптимального рівня вітаміну D, а дефіцит діагностовано у 90,0% випадків ($p < 0,05$).

Вперше доведено взаємозв'язок генотипу GA за поліморфним варіантом BsmI гена VDR та комбінації генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR з рівнем вітаміну D у дітей з АГ. Наявність генотипу CC за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR та комбінації генотипів AA/CC/AA за дослідженими алельними варіантами гена рецептора VDR були асоційовані із прогресуванням АГ у дітей.

Вперше на основі співставлення морфологічного, біохімічного та ультразвукового дослідження печінки методом еластографії зсувної хвилі в динаміці лікування запропоновано спосіб оцінки результатів еластографії зсувної хвилі у дітей з АГ до лікування та встановлено оптимальні терміни використання цього методу для оцінки фіброзу печінки у цих хворих.

Вперше за результатами проведеного дослідження встановлені предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей, серед яких: наявність автоімунних захворювань у родичів першого порядку; встановлення діагнозу після появи перших симптомів більше ніж через 12 місяців; носові кровотечі; наявність малих печінкових знаків (пальмарна еритема, телеангіектазії); підвищення рівня IgG вище норми у дітей які не отримували лікування до встановлення діагнозу; підвищення рівня γ -глобулінів вище 25,0 г/л, дефіцит вітаміну D; наявність C алелі за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR; капіляризація синусоїдів, проліферація дуктул за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки.

Для практичної охорони здоров'я запропоновано предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей, що дозволить виокремити хворих з високим ризиком швидкого формування цирозу

печінки. Рекомендовано спосіб оцінки результатів еластографії зсувної хвилі до лікування та оптимальні терміни її проведення для діагностики фіброзу печінки у дітей з АГ.

Результати наукової роботи впроваджені в роботу лікувально-діагностичних установ України.

Ключові слова: автоімунний гепатит, діти, фіброз печінки, фіброз печінки, 25(OH)D в сироватці крові, поліморфізм VDR (ApaI, BsmI, TagI), жорсткість паренхіми печінки методом еластографії зсувної хвилі паренхіми печінки, морфологічне дослідження біоптату печінки.

Список публікацій здобувача:

1. Березенко В.С., Михайлюк Х.З. Особливості маніфестації автоімунного гепатиту у дітей. Сучасна педіатрія. 2017; 6(86):80-87. (Здобувач здійснила пошук літературних даних, самостійно забезпечила відбір, обстеження та лікування хворих; обробку, аналіз та узагальнення отриманих результаті та підготовку матеріалу до друку).

2. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Шадрін В.О., Крат В.В. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей з автоімунним гепатитом. Перинатологія і педіатрія. 2018;1(73):92-98.(Здобувач провела огляд літератури, відбір пацієнтів; обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів та підготовку матеріалу до друку).

3. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Келихевич С.М. Лікувальний патоморфоз автоімунного гепатиту у дітей. «Art of medicine». 2018;3(7): 54-59. (Здобувач самостійно забезпечила відбір, обстеження та спостереження за хворих; обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів).

4. Березенко В. С., Задорожна Т. Д., Михайлюк Х. З., Тарасюк Б. А., Коробко В. Ф., Келихевич С. М. Морфологічні та ультразвукові особливості фіброзу печінки в дітей з автоімунним гепатитом. Патологія. 2018. Т. 15, 3(44): 330–336 DOI: 10.14739/2310-1237. 2018.3.1518155. (Здобувач здійснила пошук та обробку літературних даних, самостійно провела відбір хворих;

обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовку матеріалів до друку).

5. Березенко В.С. Можливості поєднання неінвазивних методів для оцінки стадії фіброзу печінки у дітей із хронічним гепатитом С. Березенко В.С., Дибба М.Б., Михайлюк Х.З., Ткалик О.М., Крат В.В., Тарасюк Б.А., Коробко В.Ф. Сучасна педіатрія. 6(94)/2018- С. 14-22- (Дисертант провела збір матеріалу, обробку отриманих даних, аналіз та узагальнення отриманих результатів підготувала статтю до друку).

6. Berezenko V. S. Correlation of polymorphous variants (ApaI, TagI, BsmI) of the VDR receptor gene with the vitamin D level and liver fibrosis in children with autoimmune hepatitis/V. S. Berezenko, H. Z. Mykhailiuk, Z. I. Rossokha, S. P. Kyriachenko // Zaporozhye medical journal 2019; 21 (4), 458–465 DOI: 10.14739/2310-1210.2019.4.173196 (Здобувач збрала, проаналізувала матеріал, самостійно забезпечила підбір пацієнтів, обробку статистичних даних, аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовку до друку).

7. Березенко В.С. Михайлюк Х.З. Дибба М.Б. Палкін А.Ю. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей хворих на автоімунний гепатит. Актуальні проблеми педіатрії. Матеріали XIII з'їзду педіатрів України (11-13 жовтня 2016 р., м. Київ). Міжнародний журнал педіатрії, акушерства та гінекології 2016 Том 10 №1:25-26. (Дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлено тези до друку)

8. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Дибба М.Б., Крат В.В. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей, хворих на автоімунний гепатит. Vol', sustavy, rozvonošnik. 2017;7(4):200-205. doi: 10.22141/2224-1507.7.4.2017.121233.- Дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлено тези до друку.

9. Михайлюк Х.З. Морфологічні особливості автоімунного гепатиту у дітей. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25 річчю Національної Академії медичних наук України, (м. Київ, 2018). «Журнал

НАМН України», Спеціальний випуск, 2018, ст.163. (Дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлені тези до друку).

10. Березенко В.С. Михайлюк Х.З., Диба М.Б., Крат В.В., Ткалик О.М. / Зв'язок забезпеченості вітаміном D у дітей з автоімунним гепатитом з поліморфними варіантами (ApaI, TagI, BsmI) гена рецептора вітаміну D (VDR)/ Матеріали VIII Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» м.Київ, 17-19 квітня 2019р С.148. (Дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлені тези до друку).

11. Дикан І.М., Тарасюк Б.А., Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Коробко В.Ф. Винахідники; Державна установа «Інститут ядерної медицини та променевої діагностики НАМН України», Державна установа «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України» патентовласники. Спосіб діагностики автоімунних захворювань печінки у дітей. Патент на корисну модель № 130181; № u201806393; Заявка 07.06.2018; опубл. 26.11.2018. Бюл. № 22.- Розділ 6. (Здобувач провела підбір хворих та аналіз отриманих результатів).

12. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Задорожна Т.Д., Тарасюк Б.А., Коробко В.Ф. Винахідники. Державна установа «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України» патентовласник. Спосіб оцінки фіброзу печінки у дітей з автоімунним гепатитом Патент на корисну модель 131392; № u201808143; Заявка 23.07.2018; опубл. 10.01.2019. Бюл. № 1.- Розділ 6. (Здобувачу належить ідея корисної моделі, ним було проведено статистичну обробку матеріалу, аналіз отриманих результатів, оформила заявку на корисну модель).

ANNOTATION

Mykhailiuk Khrystyna Zenoviivna. Improvement of diagnosis and evaluation of clinical course of autoimmune hepatitis in children. Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of Medical sciences in specialty 14.01.10 «Pediatrics». – GE «Academic O.M. Lukyanova's Institute of pediatrics, obstetrics and gynecology of NAMS of Ukraine», Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the complex study of clinical and paraclinic features of the course of AH in children, optimization of the diagnosis of the progressive course of AH by studying the effect on the disease course of the body supply with vitamin D, variants of VDR gene polymorphism and evaluation of elastography. The relationship of vitamin D supply to children with AH was investigated depending on the morpho-functional features of the disease course, the features of the VDR gene polymorphism (ApaI, BsmI, TagI), the relationship of vitamin D supply and the variant of the VDR gene polymorphism (ApaI, BsmI, TagI) were investigated and stage of liver fibrosis in children with AH, on the basis of comparison of morphological, biochemical and ultrasound examination of the liver by the method of shear wave elastography in the dynamics of treatment, a method of estimation of the results of shear elastography in children with AH to the number. The optimal timing of this method for assessing liver fibrosis in these patients has been established. According to the results of studies, predictors of the progressive course of autoimmune hepatitis in children have been established.

It is known that AH is predominantly spread among girls of prepubertal and pubertal age and this quantity makes 68,0% against 32,0% among boys ($p < 0,05$). Autoimmune pathology was high enough in the families of patients with AH reaching 30% among first line relatives. AH I type predominates in children and makes 80,0%; diagnostically significant titer of anti-LKM-1 characterizing AH II type was detected in only one patient and seronegative type of AH was found in 12%. Clinical manifestations of the diseases were found to be nonspecific and

similar to the same in acute hepatitis; they were estimated by the degree of functional disorders of the liver and were maximally expressed in patients with highly and moderately active course of AH. Main clinical symptoms of AH are intoxication, hepatosplenomegaly and extrahepatic signs, basic biochemical changes are immune-and-inflammatory and cytolytic syndromes. Cytolytic syndrome took place in 95,0% of investigated patients. Syndrome of mesenchymal inflammation in prevailing majority of patients-83,0%, was characterized by elevated γ -globulins, thymol test and IgG. In 32% of children with AH caused cirrhosis violation of protein synthetic function of the liver was detected. Histological activity (Knodell) degree and inflammation biochemical activity in the liver, according to our data, are not identical but significantly complement each other what can be proved by the fact of 5 times transaminases level increase in 19,0% of children with high histological activity.

According to the results of liver's biopsy morphology it was detected that prevailing majority of children with AH had marked fibrosis and initial signs of cirrhosis (F3-4 METAVIR) - 67,0% (n=30). Morphological signs of cirrhosis were found in 22,0% (n=10) of children. Moderate and high histological activity (9 – 18 points according to Knodell) was diagnosed in 62,0% (n=28) patients.

68,0% of children with AH have vitamin D deficiency, which doesn't depend on the season and region of residence. The lowest vitamin D level is marked in 10 – 18 years old and 5 – 18 years old boys, however reliable difference is absent. The lowest 25(OH)D concentration in serum blood was detected in winter and spring. Vitamin D deficiency in children with AH in spring made 70,0%, in summer – 85,0%, in winter – 75,0% and 55,0% in autumn ($p > 0,05$). The lowest deficiency of vitamin D in autumn may prove positive influence of insolation on vitamin D supplementation.

Analysis of vitamin D supplementation dependently on hepatitis biochemical activity demonstrated that insufficient vitamin D level was marked in clinical and laboratory remission period only. We didn't find out any reliable

difference in vitamin D supply between groups of children dependently on hepatitis biochemical activity ($p > 0,05$).

Histological activity and stage of fibrosis affect the level of 25 (OH) D in serum. In patients with IHA < 9 points, the proportion of children with vitamin D deficiency was 25,0% ($n = 7$), and in patients with IGA > 9 points – 75,0% ($n = 21$) ($\chi^2 = 5,1$; $p = 0,023$). Analysis of vitamin D availability in patients with different stages of fibrosis according to morphological study showed that in children with stage F2 fibrosis according to METAVIR, the proportion of children with vitamin D deficiency was 67,0%, with fibrosis stage F3- 75,0% and in patients with liver cirrhosis – 90,0% ($p > 0,05$).

In children with liver cirrhosis (LC), 32%, average level of vitamin D made 15,6[10–19,2] ng/ml. No child from this group had optimal vitamin D level while deficiency was detected in 89,0% of cases and insufficiency – in 11,0%. Vitamin D deficiency was reliably more often seen in children with liver cirrhosis ($p < 0,05$).

Analysis of the relationship between serum 25(OH)D concentration and polymorphic variants of the VDR gene revealed that no significant difference in vitamin D levels was detected depending on the genotypes studied, except for the BsmI allelic variant. In children with the GA genotype of the BsmI polymorphic variant, there was a significant decrease in serum 25 (OH) D concentration ($12,44 \pm 5.51$) compared to AA ($18,54 \pm 7.80$) and GG ($19,23 \pm 7.05$) ($p < 0,05$).

Children with combination of AA/TC/AA, AC/TT/GG, CC/TT/GG genotypes had significantly higher serum vitamin D levels compared to children with AC/TC/GA combination of ApaI, TagI, BsmI polymorphs VDR receptor gene ($p < 0,05$).

According to our data, children with F3 and F4 fibrosis had a significantly higher CC genotype for the VDR polymorphic TagI polymorphic variant than children with F1-F2 METAVIR ($\chi^2 = 3,953$; $p < 0,05$).

The following genotype combinations were found in children with AH: AA/TC/AA ($n = 8$), AA/CC/AA ($n = 8$), AC/TT/GG ($n = 11$), AC/ TT/GA ($n = 1$), AC/TC/GA ($n = 14$), CC/TT/GG ($n = 9$). Analysis of the effect of the combination

on the three allelic variants of the VDR receptor gene (ApaI, TagI, BsmI) on 25(OH)D and the severity of liver fibrosis showed that patients with the combination of the AA/TC/AA, AC/TT/GG genotypes, CC/TT/GG had significantly higher serum vitamin D levels than children with AC/TC/GA genotype combinations according to the polymorphic variants of the ApaI, TagI, BsmI VDR receptor gene ($p < 0,05$). Children with the AA/CC/AA genotype combination were significantly more likely to have F3 and F4 METAVIR ($\chi^2 = 3,953$; $p < 0,05$).

The CC genotype of the polymorphic TagI variant of the VDR receptor gene and combinations of the AA/CC/AA genotypes of the polymorphic variants of the ApaI, TagI, BsmI gene were associated with expressive F3 and F4 METAVIR in children with autoimmune hepatitis. Children with expressive fibrosis (F3 and F4 METAVIR) were significantly more likely to have the CC genotype of the polymorphic TagI of the VDR receptor gene ($p < 0,05$), and the AA/CC/AA genotype of the allelic variants of the VDR receptor gene ($p < 0,05$). The presence of the C allele of the polymorphic TagI variant of the VDR gene increases the risk of having a progressive stage of fibrosis 1,9 times (OR = 1,96; 95% CI 0,77-5,0; RR = 1,56; 95% CI 0,81 -3,0; Se 78%, Sp 34%).

In prevailing majority of children - 67,0% (n=30) – autoimmune hepatitis is accompanied with > F2 METAVIR. According to morphological examination 62,0% of children had > 9 Knodell's IHA points, in 60,0% of them it was highly active inflammation in the liver with > 12 Knodell's IHA points.

According to morphological investigation results in 22% of first time examined children multilobular hepatic cirrhosis signs were detected.

On the background of treatment pathomorphosis of AH with histological activity decrease with minimal detection of positive expression of CD138 plasmoid marker, Councilman acidophilic bodies decrease, reducing ability of lymphocytes to aggregate and form lymphoid follicles, absence of rosetting – basic histological markers of AH – were found out. This causes the necessity of performing puncture

biopsy before the beginning of immune suppressive treatment which helps to improve the effectiveness of AH diagnostics and treatment in children.

In 66,0% of patients detected in histological investigation fibrosis stage coincided with liver elastography results.

The use of ultrasound shear wave elastography for the assessment of the stage of fibrosis in children with AH in the period of detailed clinical manifestations is not appropriate, since the activity of hepatitis affects the indicators of rigidity of the parenchyma of the liver. At normalization of biochemical parameters there is a significant decrease in indicators of rigidity of a parenchyma of a liver ($p < 0,05$).

After 6 and 12 months of treatment, almost all children were able to achieve normalization of biochemical parameters and reduction of liver parenchyma ($p < 0,05$). The difference in liver stiffness before treatment and after 6 months of treatment reflects the contribution of the disease activity rate to the stiffness of the liver. The optimal timing of shear wave elastography for assessing the severity of liver fibrosis in children with AH has been determined.

The novelty of the study involves:

For the first time, a comprehensive examination of children with AH was found to correlate the degree of vitamin D supply of these patients with the morpho-functional characteristics of the disease.

Two thirds of children with AH, mainly with moderate and highly active hepatitis and F3 fibrosis with METAVIR, were found to have vitamin D deficiency, as well as in almost all patients with liver cirrhosis. The optimal level of vitamin D was found in 33,0% of children with minimal activity, while with high histological activity of hepatitis the optimal level was diagnosed only in 6,0% of cases and the deficiency in 76,0% of patients ($p < 0,05$). In children with F1 and F2 fibrosis by METAVIR, optimal vitamin D levels were diagnosed in 33,0% of patients, respectively, and in F3 fibrosis only in 10,0% of children. None of the patients with liver cirrhosis (F4 fibrosis stage) had optimal vitamin D levels, and deficiency was diagnosed in 89,0% of cases ($p < 0,05$).

The relationship between the GA genotype of the VDR polymorphic BsmI variant and the AC/TC/GA genotype combination of the ApaI, TagI, BsmI VDR receptor polymorphic variants with vitamin D levels in children with AH was first demonstrated. The presence of the CC genotype by the polymorphic TagI variant of the VDR receptor gene and combinations of AA/CC/AA genotypes by the investigated allelic variants of the VDR receptor gene were associated with the progression of AH in children.

For the first time, on the basis of comparing the morphological, biochemical and ultrasound examination of the liver by the method of shear wave elastography in the dynamics of treatment, a method for evaluating the results of shear wave elastography in children with AH for treatment and the optimal timing of this method to assess liver fibrosis in these patients.

For the first time, according to the results of the study, predictors of the progressive course of autoimmune hepatitis in children were established, including: the presence of autoimmune diseases in first-order relatives; diagnosis after the first symptoms more than 12 months; nasal bleeding; presence of small hepatic signs (palmar erythema, telangiectasia); raising IgG levels above normal in children not treated before diagnosis; raising the level of γ -globulins above 25,0 g/l, vitamin D deficiency; the presence of the C allele of the polymorphic variant TagI of the VDR receptor gene; capillary sinusoid proliferation, ductule proliferation as a result of morphological examination of liver biopsy specimens.

Key words: autoimmune hepatitis, children, hepatic fibrosis, 25(OH)D level in serum blood, VDR (ApaI, BsmI, TagI) polymorphism variants, hepatic parenchyma density, shear elastography of liver's parenchyma, hepatic biopsy morphologic investigation.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ АВТОІМУННОГО ГЕПАТИТУ У ДІТЕЙ (огляд літератури)	29
1.1. Особливості перебігу автоімунного гепатиту у дітей.....	29
1.2. Роль вітаміну D в розвитку та прогресуванні АГ	43
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	53
РОЗДІЛ 3 КЛІНІКО-ПАРАКЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АВТОІМУННОГО ГЕПАТИТУ У ДІТЕЙ.....	63
РОЗДІЛ 4 ОСОБЛИВОСТІ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ВІТАМІНОМ D ДІТЕЙ З АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ.....	78
РОЗДІЛ 5 ОСОБЛИВОСТІ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА РЕЦЕПТОРА VDR (ApaI, TagI, BsmI) У ДІТЕЙ З АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ.....	89
РОЗДІЛ 6 ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПЕЧІНКИ У ДІТЕЙ З АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ НА ФОНІ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ ТЕРАПІЇ.....	99
6.1. Морфологічна та імуногістохімічна характеристика автоімунного гепатиту у дітей на фоні імуносупресивної терапії.....	99
6.2. Особливості фіброзу печінки у дітей з автоімунним гепатитом в динаміці лікування за даними еластографії зсувної хвилі в співставленні з результатами морфологічного дослідження.....	109
РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	117
ВИСНОВКИ	136

	18
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	140
ДОДАТОК 1.....	159
ДОДАТОК 2.....	161

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АГ - автоімунний гепатит
ХГВ - хронічний вірусний гепатит В
ХГС - хронічний вірусний гепатит С
ХДЗП - хронічні дифузні захворювання печінки
АлАТ - аланінамінотрансфераза
АсАТ - аспартатамінотрансфераза
АЧТЧ - активований частковий тромбопластиновий час
ГГТ - гаммаглутамілтранспептидаза
ГІС - гістологічний індекс склерозу
ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота
ІГА - індекс гістологічної активності
ІФА - імуноферментний аналіз
ДВД - дефіцит вітаміну D
НВД - недостатність вітаміну D
ЛФ - лужна фосфатаза
МНВ - міжнародне нормалізоване відношення
ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція
ПТІ - протромбіновий індекс
ПГ - портальна гіпертензія
УЗД - ультразвукове дослідження
ФП - фіброз печінки
ШОЕ - швидкість осідання еритроцитів
ЦК - циркулюючі імунні комплекси
ЦП - цироз печінки
УЗД - ультразвукове дослідження
AbHBcorIgM - антитіла імуноглобуліну М до антигену вірусу гепатиту В
AbHBcorIgG - антитіла імуноглобуліну G до антигену вірусу гепатиту В
HBeAg - внутрішній компонент серцевої оболонки гепатиту В

HBsAg - поверхневий антиген вірусу гепатиту В

HBV-DNA – дезоксирибонуклеїнова кислота вірусу гепатиту В

HCV-RNA - рибонуклеїнова кислота вірусу гепатиту С

TLR - Toll подібні рецептори

VDR - рецептори вітаміну D

25(OH)D- гідроксивітамін D

1,25(OH)₂D -1,25-дигідроксивітамін D

1 α 25(OH)₂D - кальцитріол

CYP₂₇B1-25-гідроксилаза

CYP₂₄A1- 24 гідроксилаза

TNF α - фактор некрозу пухлин

F0-F4 - стадія фіброзу печінки METAVIR

F1- портальні тракти зірчастої форми

F2 - утворення порто-портальних септ,

F3 - утворенням порто-септальних септ

F4 - утворення псевдодольок

Me - в статистиці величина ознаки, що розташована в середині ряду вибірки

N-норма

OR- відношення шансів

RR- відносний ризик

Se- чутливість

Sp - специфічність

LQ-UQ - інтерквартильний інтервал

ВСТУП

Проблема хронічних дифузних захворювань печінки (ХДЗП) є одним із пріоритетних напрямків в сучасній гастроентерології та гепатології. Вагоме місце в структурі захворювань печінки посідає проблема автоімунного гепатиту. Пізня діагностика та несвоєчасне лікування цього захворювання призводить до швидкого прогресування із розвитком тяжких інвалідизуючих ускладнень з високою летальністю. Відомо, що в дитячому віці, перебіг захворювання є більш агресивним, а прогноз у таких хворих визначається своєчасним початком імуносупресивної терапії [28-30].

Прогресуючий перебіг АГ спонукає науковців до більш поглибленого вивчення патогенетичних механізмів розвитку та прогресування захворювання, пошуку факторів які впливають на перебіг захворювання та ефективність лікування. В останні роки все більше уваги приділяється дослідженню порушень обміну вітаміну D на перебіг хронічних гепатитів, як фактору, який може прискорювати прогресування патологічного процесу в печінці та негативно впливати на ефективність терапії [48-50,71]. Публікації останніх років, щодо ролі вітаміну D при різних захворюваннях гепатобіліарної системи як серед дорослих так і дітей показують, що дефіцит та недостатність вітаміну D набуває значимості предиктора розвитку широкого спектра патологічних станів та асоціюється з більш швидкими темпами прогресування захворювань.

Відомо, що холекальциферол є важливим регулятором обміну кальцію і фосфору в організмі, ключовим фактором остеогенезу та ремодуляції кісткової тканини. Крім цього, гормонально активні форми вітаміну D виявляють інші біологічні ефекти, не пов'язані з участю в регулюванні гомеостазу кісткової тканини. Зокрема, встановлено здатність вітаміну D впливати на функціональну активність клітин імунної системи, таких як моноцити, макрофаги, дендритні клітини (DCs), а також Т- і В-лімфоцити, результатом чого є модуляція як вродженої, так і набутої імунної відповіді.

Доведено, що імунні клітини експресують 25ОНD₃ 1-гідроксилазу, яка забезпечує локальним перетворення неактивного вітаміну D₃ в активну гормональну форму 1,25(ОН)₂D₃. Епідеміологічні дослідження пов'язують недостатній рівень вітаміну D з високою схильністю до виникнення автоімунних захворювань і хронічних інфекцій, обумовлених порушеннями в імунній системі [62-64,150].

За даними літератури низький рівень 25(ОН)D у пацієнтів із хронічними захворюваннями печінки (ХЗП) зустрічається в 90% випадків, а у третини з них відмічається тяжкий дефіцит (≤ 5 нг/мл (12 нмоль/л) [48-50], який корелює з гістологічними змінами та може впливати на ефективність лікування [71].

Зниження забезпеченості організму вітаміном D при автоімунному гепатиті може виникати внаслідок зниження активності печінкових вітаміну D залежних 25-гідроксилаз, основними з яких є мітохондріальна та мікросомальна ізоформи, CYP_{27A1} і 2R₁ відповідно. На сучасному етапі активно вивчається роль гена, що кодує рецептор вітаміну D (VDR). Поширеність поліморфізму гена VDR має расово-етнічні особливості. Слід також зауважити, що поліморфізм генів VDR-рецепторів корелює зі змінами механізмів реалізації регуляторного впливу вітаміну D в клітинах імунної системи, що призводить до порушення імунної відповіді, розвитку хронічного запалення та автоімунних процесів. Завдяки наявності у більшості клітин імунної системи VDR-рецепторів вітаміну D є потенційно потужним геномним регулятором, здатним нормалізувати процеси імунної відповіді та елімінації антигенів. Вітаміну D має імуномодулюючий вплив на клітини імунної системи, в тому числі Т-лімфоцити, В-лімфоцити і дендритні клітини печінки. Обмін вітаміну D в організмі регулюється більш ніж 200 видами генів, в тому числі тими, які відповідають за проліферацію, диференціювання клітин, апоптоз і ангиогенез [77,79].

В літературі сьогодні опубліковано невелику кількість досліджень присвячених вивченню впливу вітаміну D, експресії та значенню

поліморфних варіантів гену *VDR* на перебіг АГ. Ці публікації стосуються виключно дорослих хворих. За цими даними рівень забезпечення вітаміном D хворих на АГ корелює з тяжкістю перебігу захворювання, стадією фіброзу і відповіддю на лікування [71]. Експресія *VDR* в гепатоцитах, купферівських і зірчастих клітинах корелює з пригніченням та [62] подавленням фіброгенезу [110], а зниження експресії *VDR* у хворих з АГ впливає на прогресування захворювання та корелює із підвищеним ризиком розвитку фіброзу і цирозу печінки [106,111].

Окрім того, застосування в лікуванні хворих на АГ ГКС також обумовлює розвиток D вітамінної недостатності, внаслідок порушення метаболізму вітаміну D у гепатоцитах, а саме пригнічення активності 25-гідроксилази та зниження експресії її ізоензимів *CYP₂₇A1* і *CYP₂R1*.

Сьогодні «золотим стандартом» діагностики АГ, визначення стадії захворювання та активності запального процесу в печінці є морфологічне дослідження біоптату печінки. Однак враховуючи інвазивність методики, можливість розвитку ускладнень та необхідність її проведення в спеціалізованих центрах, актуальним є широке впровадження неінвазивних методів діагностики фіброзу печінки у цих хворих, особливо в дитячому віці. Серед «фізичних» методів діагностики вагоме місце посідає еластографія печінки методом зсувної хвилі для визначення жорсткості паренхіми печінки, як еквіваленту її фіброзних змін [122]. Використання еластографії для діагностики фіброзу печінки на фоні лікування АГ дозволяє оцінити потенційний ризик прогресування захворювання [137,138]. Окрім того, цей метод може бути використаний і для моніторингу відповіді на лікування у дітей з АГ [188]. Варто зазначити, що можливість використання еластографії зсувної хвилі паренхіми печінки для визначення стадії фіброзу печінки в дитячій популяції ще не вивчена.

В ДУ «ІПАГ НАМН України імені академіка О.М. Лук'янової» протягом багатьох років проводяться дослідження щодо впливу вітаміну D на мінеральний обмін та адаптаційні можливості дитячого організму.

Поглиблено вивчались забезпеченість вітаміном D окремих категорій дітей, в тому числі з хронічними соматичними захворюваннями, ревматичними хворобами [1,3-8]. В науковій літературі опубліковано невелику кількість досліджень щодо впливу вітаміну D на перебіг, прогресування та ефективність лікування автоімунного гепатиту у дітей та відсутні роботи, що стосуються зв'язку алельного поліморфізму гена рецептора *VDR* з прогресуванням автоімунного гепатиту у дітей.

Наведені вище дані були аргументом для планування та виконання даної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконана згідно з планом науково-дослідних робіт ДУ «ІПАГ імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України» і є фрагментом НДР «Дослідження ролі вітамін - D - залежних механізмів розвитку адаптаційних можливостей організму в критичні періоди дитинства та патогенезі хронічної соматичної патології у дітей» (№ державної реєстрації 01.16U001202).

Мета і завдання дослідження: оптимізація діагностики прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей шляхом дослідження впливу на перебіг хвороби забезпеченості організму дитини вітаміном D, варіантів поліморфізму гена *VDR* та оцінки результатів еластографії зсувної хвилі в діагностиці фіброзу печінки.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Вивчити клініко - параклінічні особливості перебігу автоімунного гепатиту у дітей залежно від активності гепатиту та стадії фіброзу.
2. Вивчити морфологічні особливості автоімунного гепатиту у дітей та ультразвукові критерії фіброзу методом еластографії зсувної хвилі у даного контингенту хворих до та після призначення імуносупресивної терапії.
3. Дослідити забезпеченість вітаміном D дітей з АГ залежно від активності гепатиту та стадії фіброзу.

4. Вивчити особливості поліморфізму гену *VDR* (ApaI, BsmI, TagI) у дітей з автоімунним гепатитом.

5. Вивчити взаємозв'язок забезпеченості вітаміном D з варіантом поліморфізму генів *VDR* (ApaI, BsmI, TagI) та стадією фіброзу печінки у дітей з АГ.

6. Визначити предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей та розробити спосіб оцінки результатів ультразвукової еластографії зсувної хвилі печінки для діагностики фіброзу у даного контингенту хворих.

Об'єкт дослідження - Прогресуючий перебіг АГ у дітей віком 2 -18 років.

Предмет дослідження - клінічний перебіг, функціональний стан печінки, рівень 25(OH)D в сироватці крові, варіанти поліморфізму *VDR* (ApaI, BsmI, TagI), жорсткість паренхіми печінки методом еластографії зсувної хвилі паренхіми печінки.

Методи дослідження: клінічні, біохімічні, імунологічні, імуноферментні (ІФА), молекулярно-генетичні, ультразвукові, морфологічні, імуногістохімічні, методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів:

Вперше на основі комплексного обстеження дітей з АГ було встановлено взаємозв'язок ступеня забезпеченості вітаміном D цих хворих, з морфо-функціональними особливостями перебігу хвороби.

Встановлено, що у двох третин дітей з АГ, переважно з помірно- та високоактивним перебігом гепатиту та стадією фіброзу F3 за METAVIR, мав місце дефіцит вітаміну D, а також практично у всіх пацієнтів з цирозом печінки. Оптимальний рівень вітаміну D мали 33,0 % дітей з мінімальною активністю, в той час як при високій гістологічній активності гепатиту оптимальний рівень діагностовано лише в 6,0% випадків, а дефіцит - в 76,0% пацієнтів ($p < 0,05$). У дітей з стадією фіброзу F1 та F2 за METAVIR оптимальний рівень вітаміну D діагностовано в 33,0% хворих відповідно, а з

стадією фіброзу F3 лише у 10,0% дітей. Жоден хворий з цирозом печінки (стадія фіброзу F4) не мав оптимального рівня вітаміну D, а дефіцит діагностовано у 90,0% випадків ($p < 0,05$).

Вперше доведено взаємозв'язок генотипу GA за поліморфним варіантом BsmI гена VDR та комбінації генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR з рівнем вітаміну D у дітей з АГ. Наявність генотипу CC за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR та комбінації генотипів AA/CC/AA за дослідженими алельними варіантами гена рецептора VDR були асоційовані із прогресуванням АГ у дітей.

Вперше на основі співставлення морфологічного, біохімічного та ультразвукового дослідження печінки методом еластографії зсувної хвилі в динаміці лікування запропоновано спосіб оцінки результатів еластографії зсувної хвилі у дітей з АГ до лікування та встановлено оптимальні терміни використання цього методу для оцінки фіброзу печінки у цих хворих.

Вперше за результатами проведеного дослідження встановлені предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей, серед яких: наявність автоімунних захворювань у родичів першого порядку; встановлення діагнозу після появи перших симптомів більше ніж через 12 місяців; носові кровотечі; наявність малих печінкових знаків (пальмарна еритема, телеангіектазії); підвищення рівня IgG вище норми у дітей які не отримували лікування до встановлення діагнозу; підвищення рівня γ -глобулінів вище 25,0 г/л, дефіцит вітаміну D; наявність С алелі за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR; капіляризація синусоїдів, проліферація дуктул за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки.

Практичне значення отриманих результатів:

Для практичної охорони здоров'я запропоновано предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей, що дозволить виокремити хворих з високим ризиком швидкого формування цирозу

печінки. Рекомендовано спосіб оцінки результатів еластографії зсувної хвилі до лікування та оптимальні терміни її проведення для діагностики фіброзу печінки у дітей з АГ.

Впровадження результатів дослідження

Результати проведених досліджень впроваджено в роботу ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України», НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України; КЗ «Рівненська обласна дитяча лікарня» Рівненської обласної ради; Вінницької обласної дитячої клінічної лікарні; Вінницької обласної клінічної дитячої інфекційної лікарні; Хмельницької обласної дитячої лікарні; Інститут ядерної медицини та променевої діагностики НАМН України.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням. Автором особисто проведено інформаційний пошук аналіз наукової літератури за темою дисертації, визначено мету і завдання дисертаційної роботи, сформовані групи спостереження, обрані методи досліджень, що були необхідні для виконання роботи, проведено збір первинного матеріалу, проаналізовано ефективність лікування хворих. Самостійно проведена систематизація та статистична обробка первинного матеріалу із застосуванням сучасних методів статистичного аналізу. Особисто автором написано текст дисертації, сформульовані висновки та практичні рекомендації, проведено впровадження отриманих результатів у лікувальну практику. Написано розділи дисертації та підготовлено до друку статті, тези, проведено виступи на науково-практичних конференціях.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення та результати дисертаційної роботи були представлені та обговорені на: XVIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання педіатрії» (Сидельниковські читання) (м.

Львів, 2016р); Науково-практична конференція «Актуальні питання дитячої гепатології» (м. Київ, 2016); II Науковому конгресі з міжнародною участю «Актуальні питання дитячої гастроентерології», (Київ, 2016); 19 Конгрес Словенських і чеських остеологів, (м. Жиліна, Словачія, 2016); Науково-практична конференція «Актуальні питання дитячої гастроентерології» (м. Київ, 2017); Науково-практична конференція «Актуальні питання дитячої гепатології» (м. Київ, 2017); Українсько-Білоруська міжнародна конференція «Дефіцит та недостатність вітаміну D у клінічній практиці», (м. Чернігів, 2017); XII Конгресі Педіатрів України «Актуальні проблеми педіатрії» (м. Київ, 2017); Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання дитячої гепатології», (м. Київ, 2018); Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25 річчю Національної Академії медичних наук України, (м. Київ, 2018); X конгресі Асоціації патологів України «Перспективи розвитку сучасної патології», (м. Івано-Франківськ–м. Яремче, 2018); Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної ультразвукової діагностики», (м. Київ, 2018), VIII Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (м. Київ, 2019р); Науково-практична конференція з міжнародною участю Актуальні питання сучасної ультразвукової діагностики (м. Одеса, 2019).

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 161 сторінках тексту і складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який налічує 206 наукових праць, які займають 19 сторінок. Робота ілюстрована 33 таблицями і 27 рисунками

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ АВТОІМУННОГО ГЕПАТИТУ
У ДІТЕЙ
(огляд літератури)

1.1. Особливості перебігу автоімунного гепатиту у дітей

Автоімунний гепатит (АГ) – рідкісне, прогресуюче захворювання печінки, невідомої етіології, що розвивається в осіб, які втратили імунологічну толерантність до антигенів печінки, на фоні генетично детермінованої схильності, в основі якої лежить зчепленість з певними антигенами головного комплексу гістосумісності людини (HLA) - алелями 1-B8-DR3, DR4, DR7, DR17. DRB1 * 0301 (DR3) і DRB1 * 0401 (DR4) які є основними факторами ризику розвитку АГ 1 типу у світлошкірого європейського та північноамериканського населення. А DRB1 * 0405 (DR4) є основним чинником ризику у японців та дорослих пацієнтів жителів Аргентини, а DRB1 * 0404 (DR4) - головний алель сприйнятливості до АГ у мексиканців Местізо. Czaja із співавторами [31] прийшли до висновку, що пацієнти з - DRB1 * 03 були молодшого віку, ніж пацієнти з - DRB1 * 04 і у них відмічалась гірша відповідь на кортикостероїдну терапію. Варто зазначити, що жінки частіше експресують HLA DRB1 * 04, з більшим ризиком виникнення супутньої патології з іншими імунними захворюваннями та з хорошою реакцією на кортикостероїди [32-34]. Північноєвропейські, італійські та світлошкірі американці, які є носіями DRB1*0301 і DRB1*0401 є сприятливими для розвитку АГ 1 типу [143-145]. Локуси DRB1*1501-DRB5*0101 сприяють захисту від розвитку АГ 1 типу в дорослого світлошкірого населення Америки [143]. Проведене в Латинській Америці дослідження показало, що гени DQB1*02, DQB1*0603, DRB1*0405, і DRB1*1301 алелі є ризиком розвитку АГ. Крім того, DRB1*1302 та

DQB1*0301 були захисними факторами щодо розвитку АГ [146]. Різні алелі DRB були визнано асоційованими з сприйнятливістю до АГ [45,48].

Незважаючи на той факт, що автоімунний гепатит належить до орфанних захворювань, в усьому світі спостерігається тенденція до збільшення його поширеності. Ця хвороба зустрічається у всіх вікових та етнічних групах та з найбільшою частотою в пубертатному віці. Voberg К.М. [35] стверджує, що захворюваність на АГ серед дорослого та дитячого населення Західної Європи і Північної Америки коливається від 0,1 до 1,9 на 100 000 на рік [168,169]. В Західній Європі, Північній Америці та на Кавказі поширеність захворювання складає від 50 до 200 випадків на 1 000000 населення [180]. Відповідно до даних Verma Е.С. із співавторами, [36] поширеність АГ у всьому світі складає від 2 до 17 на 100 000 дітей, проте може змінюватись в межах етнічних груп. Захворювання може реєструватись до 75 років, а найвищий рівень захворюваності у віці від 10 до 30 років. У 30-40% хворих АГ дебютує до 20 років [1,37,38]. У дітей середній вік початку захворювання - 10-14 років, однак можливий розвиток і на першому році життя. Дослідження в Росії показали, що середній вік дітей на момент обстеження становити 12,9 років [39]. 80% хворих на АГ складають жінки [26,40], співвідношенні статей 4:1 (49% - 96%) [41]. В Росії в структурі хронічних гепатитів у дітей доля АГ складає близько 2,0% [15]. Точних епідеміологічних даних щодо поширеності та захворюваності на АГ в Україні немає [14].

Актуальність проблеми АГ визначається його прогресивним прогресуючим перебігом, що призводить до швидкого формування цирозу печінки та зростання інвалідизації і смертності від цієї патології, як серед дорослих так і дітей в усьому світі. На відміну від дорослих, майже у 50% дітей АГ діагностується на стадії цирозу, та має більш агресивний перебіг, що вимагає швидкого призначення лікування [2,26,27,30]. Прогноз у таких хворих визначається своєчасним початком імуносупресивної терапії [51-53,189-194].

Незважаючи на більш низьку частоту АГ, порівняно з вірусними, в структурі ХГ, розмаїття клінічних варіантів, з високою частотою безсимптомного перебігу, визначає високу актуальність своєчасної діагностики та лікування АГ. У 2-3% випадків АГ є причиною трансплантацій печінки, що проводяться у дітей та 4-6% у дорослих в Європі та США [40,174,175]. За даними ДУ НІ ТТХ ім. О.О. Шалімова за період 2001-2011рр. АГ був причиною постановки в лист очікування для проведення трансплантації печінки від живого родинного донора в 12,2% із 90 реципієнтів [24]. 15 (8,8%) із 170 проведених в Україні за період 2001-2018рр. трансплантацій печінки проведені внаслідок АГ.

У дітей захворювання нерідко маніфестує з гострої форми і лише в подальшому носить хронічний перебіг з швидким прогресуванням. Враховуючи той факт, що у дітей захворювання може мати фульмінантний перебіг, своєчасна постановка діагнозу є дуже важливою.

Прогресуючий перебіг захворювання спонукає науковців до більш поглибленого вивчення механізмів розвитку та прогресування захворювання, пошуку факторів які впливають на перебіг та ефективність патогенетичного лікування.

АГ є багатофакторним захворюванням, в розвитку якого відіграють роль екологічні, генетичні та імунологічні чинники [45,196]. Серед тригерних факторів, що беруть участь в розвитку АГ виділяють: інфікування вірусами гепатитів А, В, С і D, вірусом Епштейна-Барр, вітряної віспи; індукування інтерферонотерапією з приводу вірусного гепатиту; індукування імунного ураження метаболітами лікарських препаратів на генетично схильного «господаря», що запускає автоімунний процес, спрямований на печінкові антигени. В останні роки одним із тригерних факторів розвитку та прогресування автоімунного гепатиту (АГ) вважають порушення обміну вітаміну D в організмі, як фактора, що може прискорювати прогресування патологічного процесу в печінці та негативно впливати на ефективність терапії [49].

Сучасні уявлення про патогенез АГ передбачають взаємодію факторів зовнішнього середовища, порушення механізмів імунної толерантності на фоні генетичної схильності. Сукупність даних факторів індукує Т-клітинні імунні реакції проти антигенів гепатоцитів, що веде до розвитку некрозапальних та фібротичних змін в паренхімі печінки [46]. Відомо, що здатністю запускати і керувати пошкодження печінки володіють CD4⁺ Т-лімфоцити, які розпізнають автоімунні пептиди на поверхні печінкових клітин. Автоантигени клітин печінки (клітинної мембрани) зв'язуються із антигенпрезентуючими клітинами або безпосередньо із гепатоцитами разом із молекулами HLA II класу, на поверхні клітини і презентують їх CD4⁺ Т-хелперним (Th0) клітинам. Th0-клітини активуються і диференціюються в функціональні фенотипи (Th1 и Th2) залежно від природи антигену і цитокінів. В подальшому каскад імунних реакцій визначається цитокінами, які продукуються Th1 і/або Th2-клітинами. Для ініціації імунної відповіді, пептид повинен знаходитись в комплексі із молекулою HLA II класу Th1-клітини, які секретують переважно IL-2 і інтерферон-гамма (IFN- γ). Ці цитокіни активують макрофаги, збільшують експресію молекул HLA I класу і індукують експресію молекул HLA II класу на гепатоцитах [17]. При недостатній імунній реакції CD8⁺ Т-супресорних лімфоцитів (Tc) активованими хелперними лімфоцитами, вивільняються і виробляються різноманітні цитокіни (IL-2, TNF- α , IFN- γ). При цьому включаються наступні механізми, які ведуть до пошкодження гепатоцита: стимуляція цитотоксичних Т-лімфоцитів; активація макрофагів за допомогою ІФН- γ ; продукція автоантитіл В-лімфоцитами або плазматичними клітинами [162]. Початковою ланкою фіброгенезу при АГ є загибель гепатоцитів шляхом апоптозу, некрозу чи апонекрозу. Загибель гепатоцитів індукує активацію клітин Купфера (Kupffer cells - KCs) та зірчасті клітини печінки (hepatic stellate cells - HSCs) [9,158-161]. Клітини Купфера продукують різноманітні прозапальні цитокіни, зокрема фактор некрозу пухлин (tumor necrosis factor - TNF- α), інтерлейкіни IL-1 β , IL-6, IL-8, які, в свою чергу, активують зірчасті

клітини печінки [160,162-164]. Запальний процес в печінці є чинником активації зірчастих клітин із зміною їх фенотипу; оксидативний стрес; дія протеаз, які активують макрофаги печінки і ендотелій синусоїдів, які починають синтезувати біологічно активні речовини - прозапальні цитокіни (IL-1,IL-4,IL-6), оксид азоту (NO), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), стимулюючий синтез колагену, активатор плазміногену, ендотелін-1, судинний епітеліальний фактор росту, тромбін, фактор роста фіброblastів і трансформуючий фактор росту (TGF β 1), дія якого опосередкована системою цитоплазматичних сигналів, перш за все SMAD-2 і SMAD-4, які сприяють розвитку і прогресування фіброзу печінки [176,177]. Активовані зірчасті клітини трансформуються в міофіброblastи, які продукують величезну кількість компонентів екстрацелюлярного матриксу, зокрема колаген (тип I) та фібронектин [163,165]. Внаслідок чого збільшується кількість клітин екстрацелюлярного матриксу, що включає декілька типів колагену I, III, IV типів, ламініну, фібронектину, глікозоміогліканів, протеогліканів, еластину, гістологічною перебудовою та відкладанням матриксу переважно в перивенулярних зонах ацинусів в субендотеліальному просторі Діссе, зміною структури ЕЦМ, що призводить до утворення сполучнотканинної мембрани у стінці венозних капілярів. Процеси фіброгенезу і прогресування захворювання асоціюються із запальними процесами в паренхімі печінки, а нездатність імунної системи повністю пригашувати запальну активність протягом 12 місяців пов'язана з прогресуванням до цирозу (54%) і смертю чи необхідністю трансплантації печінки (15%) [178]. Контроль за процесами фіброгенезу здійснюється аутокринними і паракринними факторами: SMAD-7 (білок, який кодується однойменним геном, розташований у людей на короткому плечі 18 хромосоми) блокує передачу сигналу від рецептора TGF β 1 до структур ядра зірчастих клітин печінки. В якості протизапальних факторів виступають IL-10, а також інтерферон IFN- α , IFN- γ і фактор росту гепатоцитів [179,20].

Лікування є логічною стратегією для пригнічення запальної імунноопосередкованої пошкоджуючої активності, спрямованої на запобігання прогресуванню захворювання. Попередження розвитку фіброзу є досяжною ціллю лікування автоімунного гепатиту, з використанням індивідуалізованої патогенетичної терапії.

Клінічно захворювання перебігає із гіперпродукцією гуморальної ланки імунітету, наявністю гіпергамаглобулінемії і печінково-асоційованих сироваткових антитіл, та має позитивну реакцію на імуносупресивну терапію [16,26,41,42]. АГ асоціюється з іншими автоімунними захворюваннями, що необхідно враховувати під час обстеження хворого. У дітей, будь-який тип АГ також може бути пов'язаний з автоімунним склерозуючим холангітом [43,44,47].

В 2008 році Міжнародною групою з вивчення АГ (IAIHG) була переглянута і валідизована для дитячого населення бальна система оцінки АГ. Яка включає 4 категорії: наявність автоантитіл в нижчих діагностичних титрах ніж у дорослих, підвищення рівня IgG, гістологічні критерії автоімунного гепатиту, а також відсутність вірусного гепатиту [34,37,47,50-54].

Американська Асоціація з вивчення печінки (AASLD) Британське товариство гастроентерологів, та Європейська асоціація з вивчення печінки (EASL) рекомендують проведення біопсії печінки для встановлення діагнозу АГ. До гістологічних характеристик належать:

а) Інтерфейс гепатит - є типовою гістологічною ознакою АГ. Він характеризується портальною і/або перипортальною лімфоцитарною або лімфо-плазмоцитарною інфільтрацією в портальній і перипортальній зонах, супроводжується набряком гепатоцитів і/або наявністю пікнотичного некрозу, із ступінчастими і мостовидними некрозами [76]. Спостерігається у 84-98% випадків, та має більш виразний характер в період розгорнутої клінічної картини АГ. Близько 33% хворих на АГ мають невелику кількість,

або у них зовсім відсутні плазматичні клітини в портальному тракті, і тому відсутність інфільтрації плазматичними клітинами не може виключити АГ.

в) «Емперіоплез» - є ознакою міжклітинної взаємодії, яка виникає внаслідок клітинної імунної агресії по відношенні до гепатоцитів (Т-клітинна та макрофагальна цитотоксичність), при яких некроз набуває поступового характеру і розвивається серед дрібних груп гепатоцитів перипортально відмежованої пластинки. Емперіоплез, що характеризує АГ за наявності лімфоцитів або рідше плазматичних клітин в межах цитоплазми гепатоцитів виявляється в 65-78% випадків.

г) Гепатоцелюлярні розетки, що свідчать про регенерацію клітин печінки. У дітей під час гістологічного дослідження наявність розеток є найважливішим гістологічним критерієм АГ [78,80].

Сьогодні виділяють 3 типи захворювання: найбільш поширений (80%) - 1 тип, який характеризується наявністю в крові антинуклеарних антитіл (ANA- у 80% випадків) або антитіл до гладкої мускулатури (SMA - у 63% хворих), а також антитіл до розчинного печінкового антигену (анти-SLA/P) та асоційований з HLA DR3, DR4 і DR1. Цей тип АГ зустрічається переважно в підлітковому віці та має варіабельну клінічну та гістологічну картину, добре піддається лікуванню кортикостероїдами, у 20% хворих зберігається стійка ремісія після відміни імуносупресивного лікування. В 15-34% випадків зустрічається асоціація з іншими автоімунними захворюваннями, серед яких автоімунний тиреоїдит, ревматоїдний артрит, целиакія, виразковий коліт і інші. Цирроз печінки формується у 43,0% нелікованих хворих протягом 3 років.

У 14-38% хворих дітей має місце АГ 2-го типу. Він діагностується переважно в дитячому віці, в тому числі у немовлят та характеризується наявністю антитіл до мікросом печінки і нирок 1 типу (anti-LKM-1-14-38%), або цитозольних антитіл 1 типу (anti-LC1-24-32%), а також антитіл до мікросомів печінки та нирок 3 типу (anti-LKM-3), асоціюється із HLA DR3 і DR7. Клінічно і гістологічно цей тип гепатиту характеризується тяжким і

прогресуючим перебігом, високою частотою імуноопосередкованих захворювань, нерідко гострим дебютом і швидким прогресуванням, погано піддається лікуванню, дає часті рецидиви, і вимагає довготривалої підтримуючої терапії. Цироз печінки протягом 3 років формується у 82% хворих, що погіршує прогноз захворювання.

Для 3-го типу АГ характерним є наявність антитіл до розчинного печінкового антигену (anti-SLA-7–22%), а також антитіл до розчинного панкреатичного антигену (anti-LP) та антитіла до білка Ro 52. АГ 3-го типу має більш тяжкий перебіг і погано відповідає на кортикостероїдну терапію. В ряді випадків його вважають підтипом АГ 1 типу у зв'язку із схожим клінічним перебігом. Спостерігається в осіб молодого віку, в основному у жінок (90,0%).

Окремо виділяють серонегативний АГ, при якому у 67–88% можуть визначатись антитіла до асіалоглікопротеїнових рецепторів (anti-ASGPR) [26,29,40,55].

Спектр клінічних проявів АГ є варіабельним, хвороба може перебігати у вигляді гострого гепатиту, хронічного гепатиту, а також діагностуватись на стадії цирозу печінки. За клінічними проявами АГ може нагадувати гострий вірусний, медикаментозний, токсичний гепатит. Набагато рідше, в 3-6% випадків, зустрічається фульмінантний автоімунний гепатит, який дебютує із печінкової недостатності. Безсимптомний перебіг захворювання має місце у 25–34% хворих. Симптоми розвиваються в 26 - 70% пацієнтів у віці від 2 до 120 місяців (середній інтервал 32 місяці). Серонегативний варіант, при якому можливий початок із гострої печінкової недостатності, зустрічається в 19-22% [29].

Гострий початок захворювання може мати два різних прояви. Це загострення недіагностованого або неправильно діагностованого АГ, або справжній гострий АГ без хронічних гістологічних змін [25]. Своєчасна діагностика гострого автоімунного гепатиту або фульмінантної печінкової недостатності дуже важлива, так як затримка в постановці діагнозу і

несвоєчасне лікування призводить до несприятливого прогнозу, в той час як використання імуносупресивних препаратів і стероїдів може виключити необхідність в трансплантації печінки [56,57].

Відповідно до рекомендацій EASL (European Association for the Study of Liver) «Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis European Association for the Study of the Liver 2015» «золотим стандартом» діагностики АГ є морфологічне дослідження біоптату печінки [26]. Дана методика вперше запропонована Ерліхом та Лукателло в 1884 році, а набула широкого клінічного застосування в 1958 році з появою біопсійної голки Менгіні. Гістологічне дослідження біоптату печінки з використанням стандартних барвників дозволяє оцінити характер та стадію фіброзу, а також виразність некро-запальних змін та встановити діагноз, оцінити стадію захворювання та гістологічну активність запального процесу. (індекс гістологічної активності – ІГА) [115,116]. Існують різні способи морфологічної оцінки виразності фіброзних змін в тканині печінки отриманої при біопсії. Найбільш популярною серед морфологів для оцінки фіброзу є шкала METAVIR. За цією шкалою перша стадія фіброзу характеризується розширенням та появою порталних трактів зірчастої форми, друга – утворення порто-портальних септ, третя – утворенням порто-септальних септ, четверта – утворення псевдо дольок. Незважаючи на те, що біопсія печінки тривалий час вважається «золотим стандартом», однак даний метод не дає стовідсоткової гарантії в оцінці стану СТ в силу цілого ряду причин:

- «помилка попадання», що може бути пов'язано з проходженням біопсійної голки через ділянки, які не відображають загальну морфологічну картину печінки, що зумовлює варіабельність отриманого зразка від 15 % до 65 % від істинного стану;
- помилки можливі і при недостатній кількості біопсійного матеріалу, які вміщують лише 1 чи 2 порталні тріади, чи в яких вузли гепатоцитів не оточені матриксом (при вузловій регенерації) [117].

Враховуючи інвазивність процедури та можливість розвитку ускладнень, особливо для оцінки ефективності лікування та стадії фіброзу печінки, цей метод має обмеження [118]. Слід зазначити, що в педіатрії пункційна біопсія печінки проводиться, як правило з метою первинної діагностики захворювання тож оцінка динаміки фіброзу на ґрунті лікування в подальшому має певні труднощі через інвазивність процедури. Саме тому, пошук неінвазивних і високоінформативних методів оцінки стадії АГ, як основного критерію прогнозу захворювання, має важливе клінічне значення [119].

На сучасному етапі розвитку медицини проводиться велика кількість досліджень у дітей та дорослих з хронічними гепатитами для розробки неінвазивних методів діагностики фіброзу печінки [120]. Ці тести дозволяють диференціювати хворих з високим ризиком прогресування фіброзу, проводити його моніторинг та оцінювати ефективність антифібротичної терапії. Неінвазивні методи ґрунтуються на двох різних підходах: «біологічному» – кількісне визначення біомаркерів фіброзу в сироватці крові, та «фізичному»- вимірювання жорсткості печінки [121].

Біохімічний підхід базується на визначенні лабораторних показників в крові. Серед сироваткових маркерів фіброзу виділяють прямі та непрямі маркери. До прямих маркерів фіброзу відносять медіатори фіброгенезу та компоненти екстрацелюлярного матриксу, які визначаються у сироватці крові (колаген I, III, IV типів, ГК, ламінін та його фрагменти, YKL-40, металопротеази, тканинні інгібітори металопротеаз (TIMP-1, TIMP-2), цитокіни та інші).

До непрямих маркерів фіброзу належать біохімічні показники, серед яких АСТ, АЛТ, лужна фосфатаза (ЛФ), ГГТ, загальний білірубін, альбумін, кількість тромбоцитів, холестерин, МНО та інші) та гострофазові білки (альфа-2-макроглобулін (A2M), гаптоглобін, феритин та інші) ГК, колаген IV і VI, амінотермінальний фрагмент проколагену III (P3NP), MMP і TIMP1).

Комбінації показників знайшли своє відображення в ряді тестів для визначення стадії фіброзу та відображають активність запального процесу у печінці і її синтетичну функцію та, таким чином, дозволяють опосередковано судити про стадію фіброзу [22,163,164]. Так тест Forns включає в себе визначення холестерину, тромбоцитів, (ГГТП), віку хворого. Fibro Index: тромбоцити, АСТ, γ -глобулін; FIB-4: вік, АСТ, АЛТ, тромбоцити; Тест APRI: АСТ і кількість тромбоцитів. Тест HALT-C: тромбоцити, АСТ, АЛТ, протромбіновий час (МНО); Тест MDA: альбумін, тромбоцити, лужна фосфатаза (ЛФ), АЛТ, АСТ; Тест GUCI: протромбіновий час (МНО), тромбоцити, АСТ; Тест FPI: індексу інсулінорезистентності HOMA-IR; Тест PGA: протромбіновий час, ГГТП, аполіпропротеїн А1, α 2-макроглобулін; Тест PGAA: протромбіновий час, ГГТП, апо-ліпопротеїн А1, α 2-макроглобулін; ELF: гіалуронова кислота (НА), амінотермінальний пептид проколагену III (PIIINP), тканинний інгібітор металопротеїнази (TIMP-1); FibroMaxTest (FibroTest, ActiTest, NashTest, AshTest, SteatoTest).

До фізичних методів належать методи візуалізації при яких визначається внутрішня фізична активність паренхіми печінки. До них належить: еластографія з оцінкою деформації тканин (SE), еластографія акустичного радіаційного тиску (ARFI), еластографія зсувної хвилі (pSWE ARFI), транз'єнтна еластографія (TE) 2Д та 3Д еластографія зсувної хвилі, доплерівське дослідження судин печінки, ультразвукове дослідження у В-режимі, комп'ютерна і магнітно-резонансна томографія.

Серед «фізичних» методів діагностики для визначення жорсткості паренхіми печінки вагоме місце посідає еластографія печінки методом зсувної хвилі [58,65,93,111,122,134-138].

Відповідно до рекомендацій EFSUMB 2017 перед проведенням еластографії необхідно виключити основні потенційні фактори ризику (підвищення АСТ і/або АЛТ в 5 раз вище норми, обструктивний холестаза, печінкову недостатність, гострий гепатит і інфільтративні захворювання печінки), для того, щоб уникнути переоцінки фіброзу печінки і/або

враховувати їх при інтерпретації результатів [123-133]. За даними літератури високі показники жорсткості печінки зафіксовані в пацієнтів з високоактивним АГ, і вони прогресивно знижувались при зменшенні активності [100,101]. Ультразвукова еластографія є точним методом для діагностики цирозу печінки [104]. Для діагностики відмінності між легким та помірним фіброзом цей метод є менш чутливим [102]. Застосування еластографії для діагностики фіброзу печінки на фоні лікування АГ дозволяє оцінити потенційний ризик прогресування захворювання [103].

Таким чином, використання сучасних методів діагностики, дослідження особливостей прогресування АГ у дітей з урахуванням факторів ризику, молекулярно-генетичних факторів, дозволять удосконалити діагностичні критерії перебігу хвороби та запропонувати диференційований підхід до ранньої діагностики та спостереження за хворими, що в значній мірі буде сприяти підвищенню ефективності ранньої діагностики та лікування АГ.

Основний спосіб лікування АГ є імуносупресивна терапія, метою якої є зменшення або ліквідація запалення в печінці, досягнення ремісії і попередження подальшого прогресування захворювання [57]. Імуносупресивне лікування повинно бути призначено негайно після встановлення діагнозу [180]. На відміну від дорослих, у дітей перебіг автоімунного гепатиту носить агресивний характер, і нерідко, його запізнена діагностика мають помітний вплив на результати лікування.

Ремісію при АГ можна досягнути двома методами. Методом монотерапії і методом комбінації преднізолону з азатіоприном [181]. Комбінована терапія преднізолоном і азатіоприном може проводитись вже з самого початку лікування, так як дозволяє знизити початкову дозу преднізолону і зменшити, таким чином, ризик побічних реакцій, у зв'язку з чим більш прийнятна для лікування, особливо в дитячому віці.

Відповідно до ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement 2018 дітям з АГ преднізолон призначається в початковій дозі 2мг/кг/добу

(максимально до 60мг/добу) поступово знижується протягом 4 - 8 тижнів паралельно із зниженням рівнів трансаміназ до мінімальної підтримуючої дози від 2,5 до 5 мг на добу. Через 2 тижні лікування преднізолоном, якщо рівні трансаміназ не зростають до лікування додають азатіоприн, в добовій дозі 1-2 мг/кг/добу, для попередження розвитку ускладнень пов'язаних з тривалим застосуванням ГКС. У дорослих преднізолон призначається в дозі 0,5-1 мг/кг/добу, а початкова доза азатіоприну становить 1–1,5 мг/кг маси тіла. Ці два препарати потенціюють дію один одного. Азатіоприн слід з обережністю призначати пацієнтам із злоякісними новоутвореннями, цитопенією та дефіцитом тіопуринметилтрансферази (ТМТ), а також у вагітних. У великому європейському дослідженні, що складається з 160 дорослих та 46 дітей, комбінація будесоніду та азатіоприну порівнювали з комбінацією преднізону і азатіоприну [158]. Ефект будесоніду в дозі 3 мг 3 рази на день, порівнювали з призначенням преднізону 40 мг/добу. Протягом 6 місяців лікування ремісія була досягнута в 60% випадків у групі де використовували будесонід, і лише у 39% групі преднізону. У зв'язку з чим було встановлено що комбінація будесоніду та азатіоприну більш ефективніша ніж комбінація преднізолону та азатіоприну. Однак, відсоток ремісії склав 16% для будесоніду з азатіоприном і 15% для преднізону з азатіоприном через 6 місяців, та 50% і 42%, відповідно, через 12 місяців лікування, з подібними стероїдними побічними ефектами в обох групах, окремо з більш високою частотою збільшення маси тіла у дітей з преднізоном [182]. Оскільки ці дослідження є набагато меншими за ті, що є за стандартним режимом лікування, рекомендується з обережністю застосовувати будесонід для індукції ремісії у підлітків з АГ [195].

Перспективним препаратом для лікування пацієнтів у яких є стандартна імуносупресія нездатна викликати стійку ремісію або при непереносимості азатіоприну використовують мікофенолат мофетил (MMF). MMF в дозі 20 мг/кг двічі на день разом із преднізолоном [181,183]. MMF був другим найбільш ефективним препаратом з низьким рівнем побічних

ефектів, що говорить про те, що ММФ має бути основним для терапії другої лінії у дітей з АГ, що не відповідають на стандартне лікування [184].

При неефективності попередніх описано можливість використання циклоспорину в дозі 4 мг/кг/добу розділеним на 3 прийоми, при необхідності можливе збільшення кожні 2 - 3 дні, щоб досягти цільної концентрації в крові протягом 3 місяців. Такролімус в дозі 1-6 мг/добу, частіше використовується для індукції ремісії АГ у дорослих. Описані випадки в яких встановлена ефективність інших препаратів, таких як циклофосфамід (1–1,5 мг/кг/добу) [196], метотрексат (7,5 мг/тиж.) [197] ритуксімаб (1000 мг через 2 тижні) [198] інфліксімаб (5 мг/кг в день 0, через 2 і 6 тиж, в наступному кожні 4–8 тиж. в залежності від лабораторних показників і клінічного перебігу [199].

Лікування АГ у дитячому віці та досягнення ремісії відрізняється від дорослих, у яких підвищення рівнів трансаміназ до двох норм, вважалось доброю відповіддю на лікування. У дитячому віці ремісія визначається як повне клінічне відновлення з рівнями трансаміназ в межах норми і досягається в 60% -90% пацієнтів [200-203]. Метою лікування є досягнення повної ремісії не лише на біохімічному, але і на морфологічному рівні. Швидкість і виразність відповіді на лікування залежить від тяжкості захворювання. Варто зазначити, що гістологічна відповідь, однак, не корелює із біохімічною відповіддю [187,188,191] та клініко-біохімічною та імунологічною ремісією, хоча 95% пацієнтів мають покращення гістологічної картини після середньої тривалості 4 років ефективного лікування [208]. Оскільки, біопсія печінки не може повторюватися часто, в клінічних цілях ремісія вважається завершеною, коли рівні трансаміназ і рівні IgG є нормальними, ANA і SMA негативними або низький титр (<1:20), а також анти-LKM1 і анти-LC-1 <1:10 або негативні [180].

Після досягнення ремісії лікування повинно бути продовженим, по меншій мірі, протягом 12 місяців, оскільки в протилежному випадку у 80-90% хворих розвивається рецидив. Підтримуюча терапія азатиоприном

повинна проводитись протягом 2-4 років, хоча рецидиви АГ можуть спостерігатись в більш пізні терміни (через 5 років і більше). Лікування повинне продовжуватись мінімум 3 роки і протягом не менше 24 місяців, після повної нормалізації активності амінотрансфераз сироватки крові і рівня IgG (біохімічна ремісія). Рецидив захворювання після відміни препаратів спостерігається часто (50–90 %) і найчастіше виникає в перші 12 місяців після відміни лікування [185-188]. Однак, рецидиви можуть бути і в більш пізні терміни, що свідчить про необхідність по життєвого диспансерного нагляду навіть без використання імуносупресивного лікування.

АГ без лікування має поганий прогноз, так 5-річне виживання у таких хворих складає 50,0%, 10-річне - 10,0%. В той же час своєчасне використання сучасних схем імуносупресії дозволяє контролювати перебіг захворювання [15]. Пацієнтів з печінковою недостатністю і відсутністю ефекту у вигляді зниження рівня білірубіну та індексу MELD на фоні лікування слід своєчасно направляти в центри трансплантації, оскільки без трансплантації печінки захворювання характеризується високою летальністю [189-194]. Прогноз після трансплантації печінки сприятливий, так 5-річне виживання складає більше 90,0%. Разом з тим, посттрансплантаційна імуносупресія, в першу чергу ГКС, дозволяє не тільки попередити відторгнення, а й лікувати можливий рецидив.

1.2 Роль вітаміну D в розвитку та прогресуванні АГ

В останні роки традиційна роль вітаміну D у фосфорно-кальцієвому обміні доповнилася новими даними, що дало змогу змінити погляд на його місце у розвитку різноманітних патологічних станів і захворювань. Встановлено, що вітамін D бере участь у проліферації та диференціації клітин багатьох органів і тканин, у процесі модуляції імунної відповіді, функціональної активності серцево-судинної системи, шлунково-кишкового тракту, клітин м'язової тканини [12,13,58-61,142]. Виявлено зв'язок між дефіцитом вітаміну D і розвитком серцево-судинних, автоімунних,

неврологічних та дегенеративних захворювань, цукрового діабету і деяких видів раку: товстої кишки, передміхурової залози і раку молочної залози [1,4,7,8,10,21,58,60,62-64,67,150]. Кілька досліджень у загальній популяції показали, що низька концентрація гідроксिवітаміну D (25(OH)D) значно підвищує ризик загальної смертності [66,70,87]. Частота недостатності або дефіциту вітаміну D при хронічних захворюваннях печінки збільшена порівняно з загальнопопуляційними і коливається від 64 до 92% [68,139]. Низький рівень 25(OH)D у пацієнтів із хронічними захворюваннями печінки (ХЗП) зустрічається в 90% випадків, а у третини з них відмічається тяжкий дефіцит (≤ 5 нг/мл (12 нмоль/л) [48-50], який корелює з гістологічними змінами, ступенем прогресування захворювання і розвитком фіброзу печінки, а також відповіддю на лікування [71].

Метаболіт 25(OH)D є основною циркулюючою неактивною формою вітаміну D, з періодом напіввиведення із кровотоку 2-3 тижні і вважається найкращим індикатором для моніторингу статусу вітаміну D, тому що відображає загальну кількість вітаміну D в організмі, який поступає з харчових джерел, інсоляції і перетворення з жирових відкладень в печінці [92]. За даними V.Povoroznyuk [74] в Україні 13,6 % населення мають недостатність вітаміну D (НВД), та 81,8% - дефіцит вітаміну D (ДВД), частота ДВД серед дитячого населення становить 88,5 %. У Сполучених Штатах від 25 до 50 % дорослого населення мають ДВД [75]. Доведено, що на концентрацію 25(OH)D у сироватці крові впливає географічне положення, пора року, вік, індекс маси тіла, наявність хронічних захворювань.

Вітамін D, що надходить з їжею або утворюється в організмі у процесі ендогенного синтезу, у результаті двох послідовних реакцій гідроксилування біологічно малоактивних прегормональних форм піддається перетворенню в активні гормональні види: найбільш важливий, якісно і кількісно значущий - 1,25-дигідроксिवітамін D[1,25(OH)₂D], так званий - D-гормон (кальцитріол) і мінорний - 24,25(OH)₂D. Перша реакція гідроксилування здійснюється переважно в печінці (до 90 %) за участю мікросомального ферменту 25-

гідроксилази з утворенням проміжної біологічно малоактивної транспортної форми-25(OH) вітаміну D (кальцидіолу). Гідроксилювання вітаміну D в печінці відбувається без будь-яких позапечінкових регуляторних впливів і є повністю субстрат залежним процесом. Реакція 25-гідроксилювання перебігає досить швидко і веде до підвищення концентрації 25(OH) в сироватці крові. Її концентрація відображає як надходження з їжею, так і утворення вітаміну D в шкірі, і використовується як маркер вмісту вітаміну D у сироватці крові, де 25(OH)D циркулює з вітаміном D-зв'язуючим білком (DBP), також відомим як Gc- globulin [152]. До 88 % сироваткового 25(OH)D зв'язано з DBP, який синтезується переважно в печінці і має протизапальну та імуномодулюючу функції [77]. Подальша реакція гідроксилювання 25(OH)D перебігає переважно в проксимальних відділах канальців кори нирок за допомогою 1 α -гідроксилази (CYP_{27B1}), які утворюють 1 α ,25(OH)₂D, найбільш біологічно активний і потужний метаболіт вітаміну D [77,106]. В подальшому, 24-гідроксилази, які є найбільш поширеними в кишечнику і нирках, катаболізують кальцитріол в неактивний метаболіт, який виділяється з жовчю [78]. 1 α ,25(OH)₂D має короткий період напіввиведення (4 години), а його концентрація у 1000 разів нижча від рівня 25(OH)D. Він транспортується за допомогою прикріплення до плазматичних білків, таких як DBP і визначає більшу частину біологічних ефектів вітаміну D, контролюючи експресію більш ніж 200 генів, пов'язаних з ангіогенезом, апоптозом, проліферацією, диференціюванням і імуномодуляцією [69,77-79]. Вітаміном D - зв'язуючий білок (DBP) може регулювати концентрацію вільного вітаміну D, який корелює з концентрацією активного вітаміну D, що запобігає інтоксикації [80]. Крім того, DBP запобігає катаболізму і виведенню 1 α ,25(OH)₂D. Кількість DBP знижується при захворюваннях печінки, нефротичному синдромі і недоїданні; незважаючи на це, концентрація 1 α ,25(OH)₂D залишається постійною і контролює свій власний синтез не тільки за рахунок збільшення експресії CYP_{24A1}, але, також, за рахунок можливості прямо або опосередковано інгібувати експресію

CYP₂₇B1. Крім того, було встановлено, що фермент 1- α -гідроксилаза, який забезпечує синтез 1,25(OH)₂D, присутній практично в усіх органах і тканинах (в ниркових канальцях, кишечнику, кістковій і хрящовій тканинах, клітинах шкіри, нервової системи, плаценти, селезінки, печінки, легенів, лімфатичних вузлах, скелетних м'язах, моноцитах, макрофагах, стовбурових клітинах [81]. За результатами ряду досліджень сироваткові концентрації 1,25(OH)₂D були знижені при туберкульозі, ВІЛ-інфекції, респіраторних інфекціях та вірусних гепатитах [82,83].

Зв'язок дефіциту вітаміну D з хронічними захворюваннями печінки продемонстровано в ряді клінічних досліджень [84]. Зниження концентрації вітаміну D визначалась у пацієнтів з HCV-інфекцією [85], при неалкогольній жировій хворобі печінки та неалкогольному стеатогепатиті [86]. ДВД також був пов'язаний, з підвищеною смертністю хворих з ХЗП різної етіології [170], розвитком бактеріальних інфекцій [171,172] та ступенем фіброзу [173]. Дефіцит вітаміну D при патології печінки пов'язаний з зменшеним надходженням, а також, зниженням кишкової абсорбції вітаміну, зменшенням перебування на сонці і зниженням вмісту транспортних білків. Окрім цього, при захворюваннях печінки порушене гідроксилювання вітаміну D [87].

Ряд досліджень продемонстрували негативний взаємозв'язок дефіциту вітаміну D з фіброзом печінки, що пояснюється його протизапальними властивостями, враховуючи вклад запальних клітин в формуванні фіброзу печінки [88,97,112]. Так, зниження рівня вітаміну D у хворих на цироз печінки частіше мала місце при стадії С по Чайлд-П'ю [89]. Сприятливий вплив вітаміну D при автоімунному гепатиті зумовлений його можливістю активувати і регулювати вроджений та адаптивний імунітет, стимулюючи механізми, пов'язані з ліквідацією патогенів через секрецію кателіцидину і бета-дефензимів, хемотаксис і фагоцитоз макрофагів [90,166]. Впливаючи на моноцити/макрофаг дендритні клітини, Т- і В-лімфоцити, вітамін D регулює їх проліферацію, дозрівання, активацію, секрецію ними різних чинників, у

тому числі цитокінів [140]. Вітамін D здатний модулювати диференціювання і функцію антигенпрезентуючих клітин, що призводить до пригнічення надмірної активності потенційно агресивних Т-лімфоцитів. Роль вітаміну D у диференціюванні Т-хелперів (CD4⁺-клітини) полягає в забезпеченні превалювання функції протизапальних субпопуляцій, до яких належать Т-хелпери 2-го типу (Th-2) і Т-регуляторні клітини (Treg), над прозапальними (Т-хелпери 1-го і 17-го типів – Th-1, Th-17). Він також пригнічує диференціювання В-лімфоцитів у плазматичні клітини і синтез ними антитіл класу IgM, IgG та контролює цитотоксичну активність CD8⁺. Необхідною умовою реалізації функцій вітаміну D є адекватна забезпеченість ним організму. Прозапальна активація моноцитів і макрофагів активує локальний синтез вітаміну D за рахунок підвищеної експресії CYP27B1 і місцевого виробництва 1 α ,25(OH)₂D, який пригнічує надмірну запальну відповідь. Майже 90% тканинних макрофагів знаходиться в печінці [91], тому синтез активного вітаміну D у печінці впливає на перебіг захворювання. Встановлено, що надмірна імунна відповідь може викликати пошкодження тканини печінки, а вітамін D сприяє адекватній імунній відповіді шляхом регуляції експресії декількох Toll-подібних рецепторів (TLR), і тим самим зменшується продукція прозапальних цитокінів [92].

Біологічні ефекти вітаміну D опосередковуються шляхом зв'язування з рецепторами вітаміну D (VDR), які належить до суперсімейства ядерних рецепторів стероїдних гормонів, представлені в більш ніж 30 тканинах, у тому числі в печінці, острівцевих клітинах підшлункової залози, епітеліальних клітинах шлунково-кишкового тракту, сечо-статевої системі, органах ендокринної системи, ендотелії, кровотворних клітинах, міокарді і поперечно-смугастих м'язах, моноцитах, нейронах, клітинах плаценти, а також в моноцитах крові, активованих Т- і В лімфоцитах [23,98,99]. D-гормон, проникає в ядро клітини, зв'язується із ядерним рецептором, що кодується геном рецептора вітаміну D (VDR). Комплекс гормон–рецептор реалізує свою дію через систему транскрипційних факторів або

безпосередньо зв'язуючись з функціонально - активними ділянками генів. *VDR* кодується геном *VDR*, для якого характерний генетичний поліморфізм, тобто існування різних алельних варіантів цього гена в популяції [100,141]. Обмін вітаміну D в організмі регулюється 900 видами генів, у тому числі тими, які відповідають за проліферацію, диференціювання клітин, апоптоз, ангиогенез та імуномодуляцію [74,60-62]. Ген *VDR* розміщений на довгому плечі 12-ї хромосоми (12q 13.11) розміром 75 Кб і містить 63495 пар нуклеотидів і включає 11 екзонів [11]. На сьогодні описано 1518 однонуклеотидних поліморфізми (SNP) гена *VDR* людини. З них найкраще досліджено з огляду їхньої асоціації з різними хворобами такі поліморфізми: FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236), EcoRV(rs4516035), Tru9I, Cdx2(rs11568820). Вони знаходяться між екзонами 8 і 9, окрім FokI, який розміщений на екзоні 2. Сайти рестриктаз ApaI і BsmI розміщені в інтроні 8 (некодуючій ділянці) поряд з екзоном 9 і не впливають на структуру рецептора. Зв'язуючись з *VDR*, активні форми вітаміну D здійснюють свої ефекти переважно через геномні механізми впливу. До геномних механізмів впливу відноситься підтримка стабільності геному, (поділ клітини, становлення ДНК, реструктурування хромосом), регуляція ембріогенезу, згортання крові, апоптозу, запалення. Велика кількість поліморфних генетичних варіантів пояснює варіабельність і різноманітність біологічних впливів вітаміну D. Так як рецептори вітаміну D представлені в багатьох клітинах і тканинах організму, в останні роки було проведено багато досліджень вивчення асоціації поліморфізму гена *VDR* з розвитком різноманітних захворювань, таких як: цукровий діабет, уролітіаз, псоріаз, злоякісні новоутворення, серцево-судинних та нейродегенеративних захворювань, автоімунних захворювань [147-149,167]. Показано, що носійство поліморфних генетичних варіантів пов'язане з різним рівнем вітаміну D в крові, знижений рівень якого має зв'язок з виникненням автоімунних захворювань, а саме: автоімунного тиреоїдиту, цукрового діабету 1 типу, ревматоїдного артриту, системного червоного вовчака [153-

157]. Дефіцит вітаміну D і поліморфізм його рецепторів асоційований з розвитком онкологічних захворювань [103-104]. Так, M. Vogel зі співавторами, аналізуючи вплив поліморфізму гена рецептора *VDR* при АГ та ПБЦ виявили асоціації поліморфізмів *BsmI* та *TaqI* *VDR* з ПБЦ в дорослій популяції Німеччини, а також асоціацію *FokI* і *TaqI* поліморфізм з АГ. Автори встановили суттєві зв'язки між генотипами GA ($\chi^2=8,33$; $p=0,004$, OR =0,44 [0,25-0,78]) та AA ($\chi^2=7,37$; $p=0,001$, OR=2,1 [1,22-3,62]) у пацієнтів з ПБЦ порівняно з контрольною групою. Помітно слабша асоціація з ПБЦ була додатково продемонстрована для генотипу TC ($\chi^2=4,79$; $p=0,003$, OR=0,54 [0,31-0,94]). Аналіз розподілу за поліморфним локусом *FokI* показав, що частота генотипу CC значно зростала ($\chi^2=8,09$; $p=0,004$, OR=1,94 [1,23-3,07]), а частота генотипу TT зменшувалась у порівнянні з контрольною групою ($\chi^2=5,13$; $p=0,002$, OR = 0,50[0,28-0,92]) [105].

Agnieszka Kempnińska-Podhorecka зі співавторами провели своє дослідження у дорослих з ПБЦ та виявили асоціацію генотипу AA (*BsmI* поліморфізм) із зростанням ризику ПБЦ у польських пацієнтів. Генотип CC (*TaqI* поліморфізм) частіше розповсюджений у контрольній групі порівняно з пацієнтами з ПБЦ (30,2% та 12,3%, відповідно, $\chi^2=26,07$; $p<0,001$), а частота розповсюдження генотипу TT навпаки була достовірно знижена у пацієнтів з ПБЦ (16,0% та 33,2%, відповідно $\chi^2=17,39$; $p<0,001$). Окрім того, при аналізі частот кожного алеля із трьох досліджених варіантів було показане зростання частоти розповсюдження алеля A (*BsmI* поліморфізм) (OR=1,69 [1,27– 2,24]; $p=0,0003$) та C-алеля (*TaqI* поліморфізм) (OR=0,62 [0,47– 0,82]; $p=0,0001$) у пацієнтів з ПБЦ. У пацієнтів з ПБЦ поліморфізми *BsmI* та *TaqI* були пов'язані з виразним фіброзом (F3-4 METAVIR) за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки [106].

У дослідження Tanaka зі співавторами [107] було показано асоціацію поліморфізму гена (*BsmI*, *ApaI* та *TaqI*) з ПБЦ у італійських та японських пацієнтів. Результати показують, що генотип GG та алель G (*BsmI* поліморфізм) був асоційований з ПБЦ (OR = 1,80 [95% CI; 1,19–2,73], $p =$

0,005) та (OR=1,27 [95% ДІ,1,02-1,59], $p=0,040$), відповідно. Отже, проведені дослідження свідчать, що поліморфізм *VDR* доведений як генетичний прогностичний маркер ризику ПБЦ та може бути використаним у клінічній практиці [107]. У дітей подібні дослідження не проводились. Результати наукових досліджень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1.1

Частота розповсюдження поліморфних варіантів *ApaI*, *TagI*, *BsmI* гену рецептора *VDR* у популяційних дослідженнях за принципом випадок+контроль у хворих на автоімунний гепатит та первинний біліарний цироз печінки.

Автор, країна, рік,	Ген (поліморфізм)	Поліморфний варіант	Генотип	АГ (заг.число), n,%	ПБЦ (заг.число), n, %	Контроль (заг.число) n, %
1	2	3	4	5	6	7
Vogel, Німеччина, 2002,	VDR	ApaI	AA	42 (33,0)	18 (24,0)	56 (26,0)
			AC	66 (52,0)	33 (45,0)	116 (54,0)
			CC	19 (15,0)	23 (31,0)	42 (20,0)
		TagI	TT	32 (26,0)	39(52,0)	87 (41,0)
			TC	67 (56,0)	23 (31,0)	99 (46,0)
			CC	21 (17,0)	12 (16,0)	31 (13,0)
		BsmI	GG	35 (28,0)	16 (21,0)	42 (20,0)
			GA	62 (50,0)	23 (31,0)	108 (51,0)
			AA	26 (21,0)	35 (47,0)	64 (30,0)
		FokI	CC	57(46,0)	28 (37,0)	65 (32,0)
			CT	49(40,0)	35 (47,0)	95 (44,0)
			TT	17(14,0)	11 (15,0)	51 (24,0)

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5	6	7
---	---	---	---	---	---	---

Agnieszka Kemp'nska-Podhorecka, Польща, 2012	VDR	ApaI		(n=143)	(n=306)
			AA	40 (28,0)	75 (24,9)
			AC	80 (56,0)	161 (53,5)
	TagI	CC	23 (16,0)	65 (21,6)	
		TT	20 (16,0)	100 (33,2)	
		TC	77 (53,8)	140 (54,5)	
	BsmI	CC	46 (30,2)	37 (12,3)	
		GG	20 (14,0)	95 (31,1)	
		GA	75 (52,4)	135 (44,1)	
		AA	48 (33,6)	76 (24,8)	

ApaI rs7975232 CC генотип асоціюється із прогресуванням фіброзу печінки у пацієнтів з HCV інфекцією [109]. Хворі з цирозом печінки у яких рівень 25(OH)D був ≤ 6 ng/mL та корелював із шкалами MELD і Child-Pugh, мали високий ризик декомпенсованого перебігу хвороби та 50,0% смерті протягом 24 місяців [108].

Експресія *VDR* в гепатоцитах, купферівських і зірчастих клітинах корелює з пригніченням фіброгенезу, [62,110], а розвиток фіброзу печінки пов'язаний з генетичними варіантами *VDR* та низькими показниками 25(OH)D в сироватці крові [111]. Дефіцит 25(OH)D і несприятливий поліморфізм гена *VDR* (ApaI rs7975232 поліморфізм) генотип CC збільшує ризик прогресування фіброзу печінки у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С [112]. Наявність низьких показників вітаміну D в крові було пов'язане з негативним результатом лікування ХВГ С, незалежно від генотипу, а дотація пероральних форм вітаміну D покращила відповідь на терапію і знижувала частоту рецидивів [113,114].

При важких захворюваннях печінки зменшується гідроксилування вітаміну D, синтез альбуміну, DBP і всіх речовин, синтез яких пов'язаний з рівнем 25(OH)D. Тим не менше, дефіцит вітаміну D при ХЗП тільки частково є результатом дисфункції печінки, про що свідчить той факт, що ДВД мають не тільки хворі з ЦП [59]. Концентрація 25(OH)D у хворих на ЦП

нормалізується після лікування вітаміном D, що вказує на те, що 25-гідроксилювання зберігається в циротичній печінці [148], хоча DBP помірно знижується при ЦП [167]. Це зумовлено тим, що метаболітам вітаміну D вистачає всього 5% циркулюючого в сироватці крові DBP [94]. Для розвитку ДВД при ХЗП потрібно декілька причин, окрім згаданих вище, в тому числі недостатня інсоляція, споживання вітаміну D з їжею, використання стероїдів, жовтяниця, зниження всмоктування вітаміну D, викликаного набряком кишечника та ін.

В ДУ «ІПАГ НАМН України імені академіка О.М. Лук'янової» протягом багатьох років проводяться дослідження щодо впливу вітаміну D на мінеральний обмін та адаптаційні можливості дитячого організму. Ученими інституту вивчалися забезпеченість вітаміном D окремих категорій дітей, в тому числі з хронічними соматичними захворюваннями, ревматичними хворобами, захворюваннями печінки [1,3,7]. Продовжуються дослідження, щодо ролі вітаміну D в розвитку та прогресуванні тяжкої соматичної патології у дітей [3-5,7,8]. В науковій літературі практично відсутні дослідження щодо забезпеченості вітаміном D та його вплив на перебіг, прогресування та ефективність лікування автоімунного гепатиту у дітей, є лише поодинокі дослідження у дорослих.

Вищенаведене і визначило напрямок нашого дослідження, що дозволить удосконалити діагностику прогресуючого перебігу АГ у дітей з метою запобігання розвитку цирозу печінки шляхом своєчасного призначення імуносупресивної терапії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота проводилась в Центрі дитячої гепатології ДУ «ІПАГ імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України» (завідувачка відділення – д.мед.н, В.С. Березенко), лабораторії патоморфології ДУ «ІПАГ ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України» (завідувачка – д. мед. наук, професор, член-кор. НАМН України Т.Д. Задорожна); ДУ «Інститут ядерної медицини та променевої діагностики НАМН України», (директор інституту - проф., член-кор. НАМН України І.М. Дикан); Український науково-медичний центр проблем остеопорозу ДУ «Інститут Геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» (УНМЦПО) (керівник-проф. В.В. Поворознюк); ДЗ «Референс центр з молекулярної діагностики МОЗ України», м. Київ, Україна (директор З.І. Россоха).

Для вирішення поставлених задач проведено комплексне клініко-параклінічне обстеження 60 дітей віком 2-18 років, хворих на автоімунний гепатит. Розподіл за віком та статтю представлено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл обстежених дітей за віком та статтю, абс., %

Групи обстежених	Вікові групи (роки)			Стать	
	2-5	6-10	11-18	Дівчатка	Хлопці
Автоімунний гепатит (n=60)	5(8,0)	18(30,0)	37(62,0)	41 (69,0)	19 (31,0)

Діагноз АГ встановлено відповідно до рекомендацій Європейської асоціації з вивчення захворювань печінки (European Association for the Study of Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis, 2015).

У всіх хворих дітей визначали показники загальноклінічного лабораторного обстеження (загальний аналіз крові, сечі, копрограма), біохімічного дослідження крові, які характеризують основні біохімічні синдроми АГ. Про виразність синдрому цитолізу свідчила активність аланін-та аспаргатамінотрансферази (АлАТ, АсАТ,), холестазу – активність лужної

фосфатази (ЛФ), гамаглютамілтрансферази (ГГТ), концентрації білірубину та його фракцій, холестерину; печінково-клітинної недостатності – вміст альбуміну, протромбіну (ПТІ), холестерину, сечовини, креатініну, загального білірубину та прямої його фракції; мезенхімально-запального – рівень γ - глобулінів, тимолової проби, загального білка, сироваткових Ig G, A, M та циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). Мінімальна активність характеризувалась підвищенням показників трансаміназ до 3 норм, низька - до 5 норм, помірна - підвищення АЛАТ та АсАТ до 9 норм, висока – більше 10 норм [18]. Дослідження сироватки крові проводили на біохімічному аналізаторі Фотометр-аналізатор біохімічний Labline – 70 № P06-1008. Дослідження сечі на автоматичному аналізаторі Uriscan (Південна Корея). Всім дітям, проведене визначення в сироватці крові автоантитіл (ANA (антинуклеарні антитіла), Anti-LKM-1(антитіла до мікросом печінки та нирок 1 типу), Anti-SMA (антитіла до гладких м'язів), anti-LC1(антитіла до цитозольних антитіл 1 типу), для виключення вірусної природи захворювання імуноферментним методом та методом ампліфікації з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в сироватці крові визначали маркери вірусів гепатиту: анти-HAV IgM, HBsAg, анти-HBcIgM, анти-HBc IgG, ПЛР DNA HBV, анти-HCV IgG та ПЛР RNA HCV. У всіх дітей були виключені спадкові та набуті метаболічні захворювання, недостатність альфа-1 антитрипсину, хвороба Вільсона. Отримані результати було співставлено з загально прийнятими нормами.

Для оцінки структури печінки та щитовидної залози проводили ультразвукове дослідження органів черевної порожнини, щитовидної залози на ультразвуковому апараті MyLab (Esaote S.p.A, Іспанія). З метою діагностики варикозно розширених вен стравоходу всім хворим проведено фіброезофагогастродуоденоскопію на апараті OLYMPUS (SV-150).

Для визначення статусу вітаміну D використано класифікацію, прийняту Міжнародним інститутом медицини (Institute of Medicine) та Комітетом ендокринологів зі створення настанов з клінічної практики

(Endocrine Practice Guidelines Committee) (2011p.). За даною класифікацією, дефіцит вітаміну D у дітей та дорослих - клінічний синдром, зумовлений низьким рівнем 25(OH)D у сироватці крові (менше 20 нг/мл, або 50 нмоль/л); недостатність вітаміну D - концентрація 25(OH)D у сироватці крові від 21 до 29 нг/мл (50,1 - 74,9 нмоль/л); достатній рівень вітаміну D при показнику 25(OH)D у сироватці крові понад 30 нг/мл (більше 75 нмоль/л). Для визначення рівня 25(OH)D у сироватці крові використано електрохемілюмінесцентний метод на апараті Elecsys 2010 (Roch Diagnostics, Німеччина) тест-системами cobas e 411. Сироваткові рівні загального 25(OH)D, які можна визначити за цим методом, знаходяться в межах 7,5–175 нмоль/л, коефіцієнт варіації – у межах 3,0%. У дослідження включено тих осіб, які не приймали препаратів кальцію і вітаміну D протягом 6 місяців.

Для верифікації діагнозу 45 пацієнтам виконано пункційну біопсію печінки, яка проводилась відповідно до загальної декларації з біоетики та прав людини, що ухвалена Генеральною конференцією ЮНЕСКО 19 жовтня 2005 року, після отримання інформованої згоди батьків та пацієнта на оперативне втручання. Маніпуляція проводилась під загальним знеболенням під ехографічним контролем. Застосовувалися голки гільйотинного типу (16-18 G напівавтомат) для м'яких тканин. Діаметр голки залежав від віку хворого. Морфологічне дослідження біоптату печінки проводили з використанням загальногістохімічних, імуногістохімічних методик. Отриманий біопсійний матеріал обробляли за загально прийнятими методиками. При виконанні загальногістологічного методу отриманий матеріал обробляли в парафіновій заливці, зрізи фарбували гематоксилін-еозином та пікрофуксином за Ван-Гізон та залізним гематоксиліном по Ганденгайну. Активність запального процесу характеризували за індексом гістологічної активності (ІГА) по Knodell R [58], який враховує виразність запалення. ІГА від 1 до 3 балів характеризувала мінімальну гістологічну активність, від 4 до 8 балів – низьку, від 9 до 12 балів – помірну, від 13 до 18 балів – високу гістологічну активність. Стадію захворювання оцінювали по

гістологічному індексу склерозу (ГІС) по METAVIR напівкількісно: 1 стадія фіброзу (F1) характеризується розширенням та появою портальних трактів зірчастої форми, 2 (F2) – утворення порто-портальних септ, 3 (F3) – утворенням порто-септальних септ, 4 (F4) – псевдодольок. Стан гепатоцитів (некрози, характер дистрофії) та кількість ацидофільних тілець Каунсильмена, стан зірчастих ретикулоендотеліоцитів, їх активацію, капіляризацію синусоїдів оцінювали в балах:

- 1) 0 – змін не виявлено;
- 2) 1 – наявність 30 % змінених гепатоцитів у полі зору;
- 3) 2 – до 50 % змінених гепатоцитів у полі зору;
- 4) 3 – більше 50 % змінених гепатоцитів у полі зору.

Імуногістохімічне дослідження біоптатів здійснені з використанням імуногістохімічного маркера плазмоцитів CD 138 Ab-2 (Clone M15) фірми Thermo Scientific на мікроскопі («OLYMPUS BX-51») із комп'ютерною приставкою з фотодокументуванням. В тканині печінки визначали експресію CD138 (кластер диференціації 138: мембранний білок, який використовують в якості імунологічного маркера плазматичних клітин. Оцінку цих методів проводили з використанням мікроскопу «OLYMPUS BN-2» зі збільшенням від ста до чотирьохсот раз.

Усіх хворих ми розподілили на групи: до I групи увійшли діти, які до моменту проведення пункційної біопсії печінки не отримували глюкокортикостероїди (ГКК) (n=25), II група діти які отримували ГКК на час проведення пункційної біопсії печінки (n=20).

Визначення жорсткості паренхіми печінки проводилось в ДУ «Інститут ядерної медицини НАМН України», м. Київ методом еластографії зсувної хвилі паренхіми печінки на сканері «Радмир ULTIMA» в ділянці правих міжреберних проміжків за допомогою трансабдомінального конвексного (5мГц) та лінійного (10 мГц) датчиків для поверхневих структур. Медіанне значення отриманих вимірів характеризувало еластичність паренхіми печінки, результат виражався у кілопаскалях (кПа). Для інтерпретації

отриманих показників та визначення стадії фіброзу ми використали дані дослідження L. Castera та співавторів, відповідно до яких рівню виразності фіброзу F0 відповідали значення еластографії нижче 5,8 кПа, F1 $\geq 5,8 - \leq 7,2$ кПа (мінімальні зміни), F2 - $\geq 7,2 - \leq 9,5$ кПа (помірні), F3 - $\geq 9,5 - < 12,5$ кПа (виразні) та F4 – від 12,5 кПа (цироз печінки) [120]. Для оцінки впливу імуносупресивної терапії на активність захворювання та показники жорсткості паренхіми печінки у 35 пацієнтів проведено еластографію печінки зсувної хвилі через 6 та через 12 місяців імуносупресивної терапії.

Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів гена рецептора *VDR* було проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у 51 дитини. За допомогою комерційної тест-системи «Quick-DNA Miniprep Plus Kit» (виробництва Zymo Research, США) було проведено виділення ДНК із периферичної крові. Для визначення поліморфних варіантів *BsmI* G/A (rs1544410), *TaqI* T/C (rs731236) та *ApaI* A/C (rs7975232) [23] гена рецептора *VDR* використовували модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами та проводили аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Досліджувані ділянки генів ампліфікували за допомогою специфічних праймерів (виробництва «Metabion», Німеччина). Специфічні фрагменти гена *VDR* ампліфікували із застосуванням комерційного набору DreamTaq Green PCR Master Mix (виробництва «Thermo Scientific», США) (табл.2.2).

Таблиця 2.2

Склад ампліфікаційних сумішей

Ген (поліморфізм)	Реагенти	Кількість
1	2	3
<i>VDR BsmI G/A</i> (rs1544410)	DreamTaq Green Master Mix	12,5 μ l
	праймер F	30 pmol (0,3 μ l)
	праймер R	30 pmol (0,3 μ l)

Продовження таблиці 2.2

1	2	3
---	---	---

	Вода	8,9 μ l
	ДНК	3 μ l
Загальний об'єм суміші		25μl
<i>VDR TaqI T/C</i> (rs731236)	DreamTaq Green Master Mix	12,5 μ l
	праймер F	30 pmol (0,3 μ l)
	праймер R	30 pmol (0,3 μ l)
	Вода	8,9 μ l
	ДНК	3 μ l
Загальний об'єм суміші		25μl
<i>VDR ApaI A/C</i> (rs7975232)	DreamTaq Green Master Mix	12,5 μ l
	праймер F	30 pmol (0,3 μ l)
	праймер R	30 pmol (0,3 μ l)
	Вода	8,9 μ l
	ДНК	3 μ l
Загальний об'єм суміші		25μl

Готували загальні робочі суміші з відповідними праймерами для постановки реакції ампліфікації фрагментів гена *VDR* та розносили їх по окремим пробіркам, останніми додавали зразки ДНК (табл.2.3). Пробірки з готовою ампліфікаційною сумішшю переносили в ампліфікатор «FlexCycler BU» (Analytik Jena, Німеччина) для забезпечення відповідного температурного режиму полімеразної ланцюгової реакції (табл.2.3).

Таблиця 2.3

Режими ампліфікації фрагментів ДНК

Ген (поліморфізм)	Етап	Температура	Час	Кількість циклів
1	2	3	4	5
<i>VDR BsmI G/A</i> (rs1544410)	Передплавлення	94 ⁰ С	2 хв	} X 35
	Плавлення	94 ⁰ С	30 с	
	Відпал	63 ⁰ С	30 с	
	Синтез	72 ⁰ С	30 с	
	Пролонгація синтезу	72 ⁰ С	2 хв	

Продовження таблиці 2.3

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

<i>VDR TaqI T/C</i> (rs731236)	Передплавлення	94 ⁰ С	2 хв	} X 35
	Плавлення	94 ⁰ С	1 хв	
	Відпал	63 ⁰ С	1 хв	
	Синтез	72 ⁰ С	1 хв	
	Пролонгація синтезу	72 ⁰ С	2 хв	
<i>VDR ApaI A/C</i> (rs7975232)	Передплавлення	94 ⁰ С	2 хв	} X 35
	Плавлення	94 ⁰ С	30 с	
	Відпал	65 ⁰ С	30 с	
	Синтез	72 ⁰ С	30 с	
	Пролонгація синтезу	72 ⁰ С	2 хв	

Продукти ампліфікації фрагментів ДНК (амплікони) гена *VDR* підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції *BsmI*, *TaqI* та *ApaI* («Thermo Scientific», США). Готувались окремі суміші для рестрикційного аналізу та розносились по промаркованим пробіркам, додавались амплікони. Склад компонентів суміші наведено в табл.2.4.

Таблиця 2.4.

Склад рестрикційних сумішей для ПДРФ аналізу

Поліморфізм	Реагенти	Об'єм	Розмір рестрикційних фрагментів
<i>VDR BsmI G/A</i> (rs1544410)	10хБуфер <i>R</i>	1 µl	Генотип <i>GG</i> :644 та 179 п.н.
	Фермент <i>BsmI</i>	1 µl	Генотип <i>GA</i> :
	Вода	8 µl	823, 644 та 179 п.н.
	Амплікон	5 µl	Генотип <i>AA</i> : 823 п.н.
<i>VDR TaqI T/C</i> (rs731236)	10хБуфер <i>TaqI</i>	1 µl	Генотип <i>TT</i> : 496 та 249 п.н.
	Фермент <i>TaqI</i>	1 µl	Генотип <i>CT</i> :
	Вода	8 µl	496, 295, 249 та 201 п.н.
	Амплікон	5 µl	Генотип <i>CC</i> : 295, 249 та 201 п.н.
<i>VDR ApaI A/C</i> (rs7975232)	10хБуфер <i>B</i>	1 µl	Генотип <i>AA</i> : 501п.н.
	Фермент <i>ApaI</i>	1 µl	Генотип <i>AC</i> :
	Вода	8 µl	501, 288 та 213 п.н.
	Амплікон	5 µl	Генотип <i>CC</i> : 288 та 213 п.н.

Реакцію рестрикції ділянок *BsmI G/A* (rs1544410) та *VDR ApaI A/C* (rs7975232) гена *VDR* проводили згідно рекомендацій виробника у

твердотільному мікротермостаті за температури 37°C протягом 16 год. Зупиняли процес підвищенням температури до 65°C на 20 хв. Рестрикція TaqI T/C (rs731236) гена *VDR* здійснювалася протягом 16 год за температури 65°C без подальшої термоінактивації фермента (за інструкцією). Стан рестрикційних фрагментів гена *VDR* аналізували в 3% агарозному гелі (агароза «Clever Scientific», Великобританія) з додаванням барвника, бромистого етидію. Для оцінки розміру фрагментів вносили маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp DNA Ladder («Thermo Scientific», США). Візуалізували розподіл фрагментів у гелі за допомогою транслюмінатора. Обробка зображення проводилася в програмі Vitran (рис.2.1-2.3).

Як видно з рисунку 2.1 амплікони BsmI G/A (rs1544410) гена *VDR* підлягали гідролітичному розщепленню за наявним сайтом рестрикції 5'-GAATGCN↓-3', внаслідок чого утворювалися фрагменти з молекулярною вагою 644 п.н. та 179 п.н. – генотип GG. Сайт рестрикції зникав при нуклеотидній заміні G на A, тому якщо розмір фрагменту ампліфікованої ділянки ДНК після взаємодії з рестриктазою залишався незмінним (823 п.н.), реєструвався генотип AA. Відповідно у гетерозигот (генотип GA) спостерігалися всі три типи фрагментів одночасно: 823, 644 та 179 п.н.

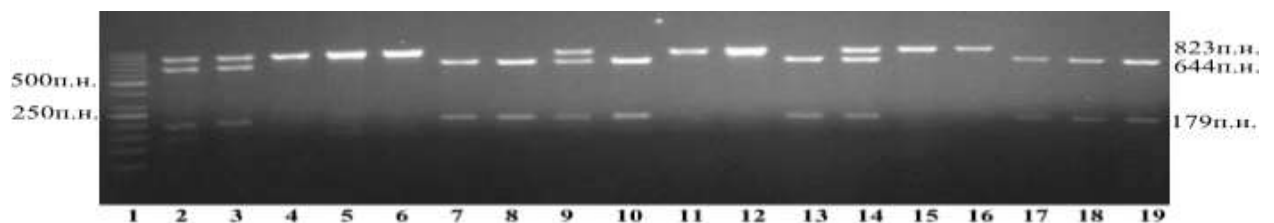


Рис.2.1. Електрофореграма розподілу рестрикційних фрагментів BsmI G/A (rs1544410) гена *VDR*

1 – маркер молекулярної ваги ,
зразки 7-8, 10, 13, 17-19 – генотип GG,
зразки 2, 3, 9, 14 – генотип GA,
зразки 4-6, 11-12, 15-16 – генотип AA.

На рисунку 2.2 представлена електрофореграма рестрикційних фрагментів TaqI T/C (rs731236) гена *VDR*. Амплікони підлягали

гідролітичному розщепленню ендонуклеазою *TaqI* за специфічним сайтом рестрикції 5'-T↓CGA-3'. На ампліфікованій ділянці гена *VDR* завжди присутній один з таких сайтів, під дією ендонуклеази *TaqI* утворюючи фрагменти розміром 496 та 249 п.н.. За їх наявності визначали генотип ТТ. В результаті нуклеотидної заміни Т на С з'являється додатковий сайт рестрикції. Внаслідок чого при генотипі СС крім 249 п.н. утворювалися рестрикційні фрагменти з молекулярною вагою 295 п.н. та 201 п.н. У гетерозигот (генотип ТС) спостерігалися відповідно фрагменти 496, 295, 249 та 201 п.н.

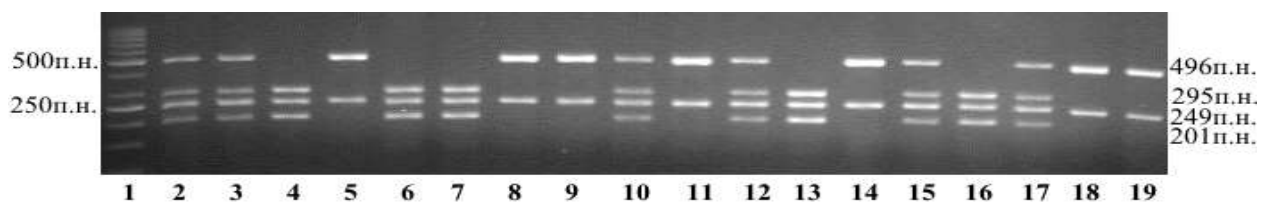


Рис. 2.2 Електрофореграма розподілу рестрикційних фрагментів *TaqI* Т/С (rs731236) гена *VDR*

1 – маркер молекулярної ваги,
зразки 5, 8-9, 11, 14, 18-19 – генотип ТТ,
зразки 2, 3, 10, 12, 15, 17 – генотип ТС,
зразки 4, 6, 7, 13, 16 – генотип СС.

Розмір ампліфікованого фрагменту *ApaI* А/С (rs7975232) гена *VDR* залишався незмінним (501 п.н.) при дії ендонуклеази рестрикції *ApaI* за відсутності нуклеотидної заміни (генотип АА). Наявність поліморфного варіанту визначали за появою сайту рестрикції 5'-GGGCC↓C-3' в результаті чого формувалися фрагменти розміром 288 та 213 п.н. (генотип СС). Гетерозиготи (генотип АС) характеризувалися наявністю всіх видів фрагментів: 501 п.н., 288 п.н., 213 п.н.

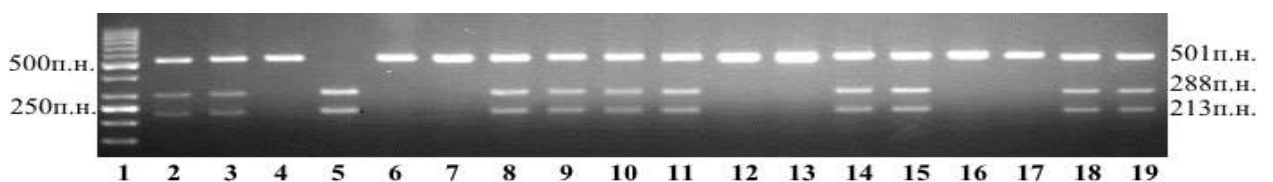


Рис. 2.3 Електрофореграма розподілу ампліфікованих фрагментів *AraI* A/C (rs7975232) гена *VDR*

1 – маркер молекулярної ваги,
зразки 4, 6-7, 12-13, 16-17 – генотип AA,
зразки 2-3, 8-11, 14-15, 18-19 – генотип AC,
зразок 5 – генотип CC.

Отримані дані опрацьовано статистично з використанням пакета програм Statistica 6.1 та IBMSPSS Statistic версія 22 № 128 від 01.08.2016. Загально статистичний аналіз передбачав обчислення медіани та інтерквартильних інтервалів $Me[UQ—LQ]$. Для номінальних змінних взаємозв'язок розраховували за допомогою критерію Пірсона (χ^2) та критерію Фішера (двосторонній), для оцінки різниці між двома незалежними вибірками використовували U-критерій Манна-Уїтні. Для порівняння двох залежних вибірок до та після лікування ми використовували критерій Вілкоксона. Оцінку напряму, сили та значущості кореляційного зв'язку між різними ознаками проведено із використанням непараметричного кореляційного аналізу Тау Кендалла (τ) та Спірмена (R). Проведено аналіз операційної характеристичної кривої (Receiver Operating Characteristic Curve - ROC) з визначенням AUROC та «точки відсічення» яка відповідає найкращим результатам щодо чутливості та специфічності даного діагностичного методу. Для підтвердження діагностичної ефективності проведений математичний аналіз методом розрахунку показників чутливості (Se), та специфічності (Sp), позитивної та негативної прогностичної цінності тестів (PV), точність. Оцінка впливу несприятливих факторів проводилась методом розрахунку відносного ризику (RR) та відношення шансів (OR) для показників, які мали достатньо високу специфічність та чутливість. Різницю вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

КЛІНІКО-ПАРАКЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АВТОІМУННОГО ГЕПАТИТУ У ДІТЕЙ

Для виконання поставлених завдань в центрі дитячої гепатології ШПАГ імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України, були вивчені клініко-параклінічні особливості перебігу автоімунного гепатиту (АГ) у 60 дітей віком 2 - 18 років.

Серед обстежених хворих превалювали дівчатка 68,0% (n=41), хлопців було 32,0% (n=19) (p < 0,005). Такий розподіл відповідає даним літератури і може бути генетично детермінований та асоційований з системою антигенів HLA: DRB1* 04 [32-34].

За нашими даними, АГ зустрічається переважно у пре - та пубертатні періоди дитинства. Так, у більшості - 62,0 % (n=37) хворих АГ вперше діагностовано у віці 11 – 18 років, у 30,0 % (n=18) в 6 - 10 річному віці ($\chi^2 = 13,13$; p = 0,0003 між групою дітей 6-10 та 11-18 років). У 8,0 % (n=5) хворих АГ було діагностовано до 5 років ($\chi^2 = 48,76$; p < 0,0001 між групою дітей до 5 років та 11-18 років; $\chi^2 = 14,7$; p = 0,0001 між групою дітей до 5 років та 6-11 років). АГ II типу був діагностований у однієї дитини 3-х річного віку. Медіана віку для дівчаток на момент обстеження складала 11[8 - 15] років, хлопців – 12[8 - 15] років (p > 0,05).

У більшості - 63,0 % (n= 38) пацієнтів захворювання маніфестувало у весняно-літній період ($\chi^2 = 8,53$; p = 0,0035), що може свідчити про роль надмірної інсоляції, як тригерного фактору автоімунних реакцій. У 13,0% (n=8) дітей захворювання вперше проявилось після перенесеної ГРВІ, у 12,0% (n=7) після прийому альбендазолу, 7,0 % (n=4) після перенесеної вітряної віспи, у однієї дитини захворювання маніфестувало після прийому ізоніазиду – 2,0%, у 67,0% (n=40) не вдалось встановити тригеру розвитку АГ. За даними анамнезу у 48,0% (n=29) хворих діагностичний пошук з моменту появи перших скарг до встановлення діагнозу складав 1-1,5 років. У 52,0% (n=31) пацієнтів, тривалість хвороби не вдалося встановити у зв'язку з

відсутністю клінічної симптоматики гепатиту. Батьки вважали цих дітей здоровими і не звертались за медичною допомогою. Про труднощі в постановці діагнозу свідчить той факт, що лише у 42,0 % (n=25) дітей діагноз був запідозрений, або встановлений за місцем проживання, У 58,0 % (n=35) хворих діагноз встановлено під час обстеження в клініці інституту.

У 32,0 % (n=19) дітей діагноз встановлено на стадії цирозу печінки, із них 84,0% (n=16) мали клас А за Чайлд-П'ю, в 11,0% (n=2) діагностовано клас В, а клас С - лише у 1(5,0%) дитини (таблиця 3.1). Пізня діагностика АГ у таких хворих, з найбільшою ймовірністю, пов'язана з малосимптомним перебігом хвороби.

Таблиця 3.1

Характеристика обстежених дітей з автоімунним гепатитом, (n=60), абс.ч. (%)

Стать:	
- хлопчики	19 (32,0%)
- дівчатка	41(68,0%)*
Вік, роки:	
- 2-5	5 (8,0%) ♦
- 6-10	18 (30,0%) •
- 11-18	37 (62,0%)
Цироз печінки, стадія по Чайлд-П'ю	
Стадія А	16 (84,0)
Стадія В	2 (11,0)
Стадія С	1 (5,0)
Примітки: *- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) за статтю;	
♦- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групою дітей 6-10 та 11-18 років;	
•- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групою дітей до 5 років та 11-18 років.	

З анамнезу відомо, що в родинях дітей з АГ достатньо високою була частота автоімунної патології, що свідчить про генетичну схильність до автоімунних захворювань. У 30,0 % (n=18) дітей родичі першого порядку

мали різноманітні автоімунні захворювання: автоімунний тиреоїдит 44,0% (n=8), ревматоїдний артрит – у 33,0% (n=6), бронхіальна астма – у 6,0 % (n=1), цукровий діабет першого типу – у 17,0 % (n=3) (Рис. 3.1).

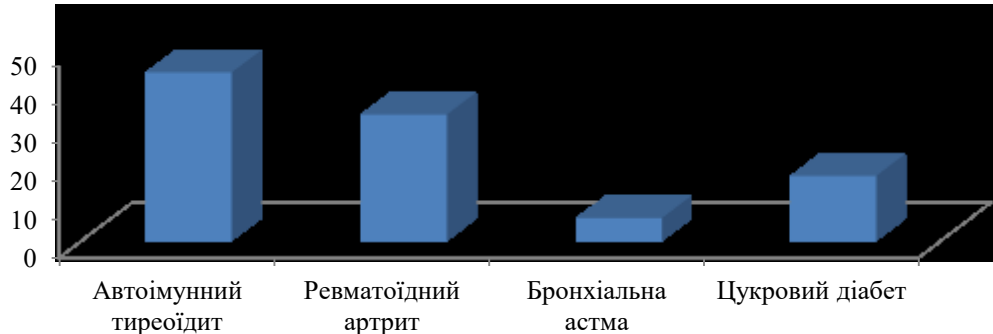


Рис. 3.1. Частота автоімунної патології в сім'ях дітей хворих на АГ, %

Аналіз структури та частоти захворюваності дітей з АГ (таблиця 3.2) показав, що діти хворі на АГ мали невисоку частоту інфекційної патології в анамнезі, що може свідчити про високу толерантність імунної системи до подразників, зрив якої при несприятливих обставинах закінчується гіперергічним автоімунним процесом. Так у хворих мали місце вогнища хронічної інфекції, а саме: хронічний тонзиліт у 38,0% (n=23), карієс у 9,0%. Часті ГРВІ в анамнезі у 23,0% (n=14) випадків, а вітряна віспа була у 23,0% (n=14) хворих. Частота іншої патології була незначною. (Таб. 3.2).

Таблиця 3.2.

Структура та частота інфекційної захворюваності дітей з АГ (абс.ч., %).

Нозологічні форми	Кількість хворих
Часті ГРВІ	23,0
Рецидивуючий бронхіт	7,0
Вітряна віспа	23,0
Хронічний тонзиліт	38,0
Карієс	9,0

У 60,0 % (n=36) дітей захворювання мало гострий початок, клінічна картина якого була подібна до гострого вірусного гепатиту. Клінічна картина

дебюту визначалась активністю гепатиту та ступенем порушення функціонального стану печінки.

В усіх обстежених дітей були прояви астено-вегетативного синдрому (підвищена втомлюваність, емоційна лабільність, тощо), в основі якого лежить хронічна неспецифічна інтоксикація, зумовлена ендотоксикозом та вегетативними розладами. Пароксизмальні порушення нічного сну мали 3,0% (n=2), тривожний розлад 3,0 % (n=2) хворих. Диспепсичний синдром у вигляді зниження апетиту, нудоти, блювоти, метеоризму, порушення стільця діагностовано у 67,0% (n=40) хворих. Помірний больовий абдомінальний синдром, який проявлявся ниючими болями в правому підребр'ї чи епігастрії мав місце у 42,0% (n=25) дітей та, з найбільшою ймовірністю, пов'язаний із супутньою патологією шлунково-кишкового тракту, яка була діагностована у цих хворих.

У 75,0% (n=50) хворих виявлені різного ступеня виразності малі печінкові знаки: пальмарна еритема, телеангіектазії переважно на кистях рук, обличчі та верхньому плечовому поясі. Малі печінкові знаки представлені з однаковою частотою у дітей з різним ступенем активності гепатиту: у 82,5% (n=33) хворих з помірною та високою активністю АГ та у 82,0 % (n=14) дітей з низькою та мінімальною активністю запального процесу в печінці. У дітей в періоді ремісії захворювання малі печінкові знаки були лише в 33,0% випадків (n=1). Жовтяницю (у вигляді жовтушності склер та шкіри) мали 73,0% пацієнтів з АГ. Жовтушність шкіри найчастіше реєструвалась в групі дітей з високою та помірною активністю в 72,5% (n=29), при низькій та мінімальній активності гепатиту лише в 29,0% (n=5) ($\chi^2 = 9,02$; $p < 0,005$ між групою з високою та помірною та низькою та мінімальною активністю). Жовтушність склер достовірно частіше встановлена у дітей з високою та помірною активністю в порівнянні з дітьми з неактивним гепатитом ($\chi^2 = 3,61$; $p = 0,005$). Варто зазначити, що незначний свербіж шкіри відмічався лише у 2 хворих з високою активністю гепатиту. У 50,0% хворих мали місце прояви геморагічного синдрому у вигляді носових кровотеч. У більшості (75,0%)

хворих періодичні носові кровотечі були ще до маніфестації розгорнутої клінічної картини АГ. Гепатомегалія за рахунок збільшення обох часток печінки виявлена у 67,0% дітей. З найбільшою частотою цей симптом зустрічався у хворих з високою та помірною активністю АГ та виразним фіброзом (F3–4 METAVIR). За даними об'єктивного обстеження спленомегалія різного ступеня мала місце у 48,0 % хворих, при цьому у 96,0% дітей з стадією фіброзу F3-4 METAVIR (Таблиця 3.3).

Таблиця 3.3.

Основні клінічні симптоми у дітей хворих на АГ (n=60) абс.ч.,%

Симптоми	Частота виявлення		
	Помірна та висока біохімічна активність (n = 40)	Мінімальна та низька біохімічна активність (n = 17)	Період клініко-лабораторної ремісії (n = 3)
Блідість шкіри	19 (47,5)	11 (65)	2(67,0)
Периорбітальний ціаноз	29 (72,5)	8 (47,0)	2(67,0)
Жовтушність шкіри	29 (72,5)*	5 (29,0)	1(33,3)
Жовтушність склер	33 (82,5)	10 (59,0)	1(33,3)
Малі печінкові знаки:(пальмарна еритема, телеангіоектазії)	33 (82,5)♦	14 (82,0)	1(33,3)
Гепатомегалія	28 (70,0)	11 (65,0)	1(33,3)
Спленомегалія	18 (45,0)	9 (52,0)	1(33,3)

Примітки: * - відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групою з високою і помірною та низькою і мінімальною активністю АГ;
♦ - відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групою дітей з високою та помірною активністю та періодом клініко-лабораторної ремісії.

Супутні захворювання органів травлення діагностовано у 42,0% (n=25) дітей: езофагіт - 20,0 % (n=12); хронічний гастродуоденіт – 10,0% (n=6),

дуодено-гастральний рефлюкс мав місце у 9,0% (n=5), виразка шлунка -3,0 % (n=2) хронічний коліт – 5,0% (n=3).

В у 63,0% (n=38) дітей хворих на АГ мали місце різноманітні позапечінкові системні прояви АГ. Так, автоімунний тиреоїдит діагностовано у 15,0% (n=9), автоімунна гемолітична анемія у 2,0% (n=1), неспецифічний коліт-5,0% (n=3), вітиліго - в 2,0% (n=1)., псоріаз у двох хворих(3,0%). Артралгії транзиторного характеру різного ступеня виразності мали місце у 15,0% (n=9) дітей. У 52,0% (n=13) дівчаток пубертатного віку спостерігались порушення оваріально-менструального циклу, а саме: дисменорея – у 62,0 % (n=8) та аменорея – у 38,0 % (n=5).

За результатами лабораторного дослідження провідними біохімічними синдромами у дітей з АГ були цитолітичний (гіпертрансаміназемія за рахунок підвищення АлАТ, АсАТ,) мезенхімально-запальний (гіперпротеїнемія, гіпергаммаглобулінемія, зростання тимолової проби, пришвидшення ШОЕ, підвищення рівня IgG), холестатичний синдроми (гіпербілірубінемія за рахунок прямої фракції, ріст активності лужної фосфатази, зростання ГГТ) та наявність сироваткових автоантитіл. У дітей з прогресуючим перебігом захворювання та цирозом печінки на ґрунті автоімунного гепатиту мав місце синдром печінково-клітинної недостатності, що проявлявся гіпоальбумінемією, зниженням протромбінового індексу, МНВ, холестерину та ін. показників, які вказують на зниження синтетичної функції печінки. Троє з обстежених дітей знаходились в періоді неповної клініко-лабораторної ремісії, тому для подальшого аналізу та характеристики частоти біохімічних проявів усіх дітей з АГ ми розділили на 3 групи за показника біохімічної активності гепатиту (Таблиця 3.4).

Синдром цитолізу (підвищення рівня трансаміназ в межах 3-20 норм, мав місце у 95,0 % обстежених. У трьох дітей (5,0%), які перебували в періоді неповної клініко-лабораторної ремісії, спостерігались нормальні рівні трансаміназ крові.

Мезенхімально-запальний синдром в переважній більшості хворих характеризувався підвищенням рівня γ -глобулінів (83,0%), тимолової проби (78,0%), та IgG (57,0%). Підвищення тимолової проби достовірно частіше реєструвалось в групі дітей з високою та помірною активністю ($\chi^2 = 5,28$; $p < 0,005$ між підгрупами з високою та помірною та низькою і мінімальною активністю АГ). Гіперпротеїнемія виявлена у 50,0 % дітей з АГ. Підвищення ШОЕ мало місце в 35,0% обстежених, з них у 45,0% дітей з помірною та високою активністю, та лише у 18,0% при низькій та мінімальній активності ($\chi^2 = 3,84$; $p < 0,005$ між підгрупами з високою та помірною та низькою і мінімальною активністю АГ).

Синдром холестазу у хворих з АГ був представлений гіпербілірубінемією. Підвищення рівня білірубіну переважно за рахунок прямої фракції достовірно частіше реєструвалось у дітей з високою та помірно активним гепатитом ($\chi^2 = 12,5$; $p < 0,005$ між групою з високою та помірною активністю та АГ в періоді ремісії). Зростання ГГТ виявлено у 92,0 % дітей ($n=50$). Так, у однієї дитини з неактивним гепатитом мало місце підвищення рівня гаммаглутамілтрансферази.

Визначення профілю антитіл з метою встановлення типу АГ було проведено в усіх (100,0 %) обстежених дітей. Отримані дані свідчать, що АГ I типу (який характеризується наявністю в сироватці крові ANA і/або anti-SMA) діагностовано у переважної більшості хворих – 80,0 %, в той час як діагностично значимий титр anti-LKM-1, що характеризує АГ II типу встановлено лише у 3,0 % обстежених. Серонегативний варіант АГ мав місце у 12,0% обстежених дітей.

Дослідження ЦІК в сироватці крові показало, що їх рівень в 5-10 разів (при нормі $< 0,025$ г/л) підвищений практично у всіх хворих 93,0% ($n=56$), що є свідченням важливої ролі імуннокомплексного механізму в розвитку імунного запалення у дітей з АГ.

Таблиця 3.4

Частота виявлення біохімічних та імунологічних синдромів у дітей з АГ, (n=60) абс.ч., %

Біохімічні та імунологічні показники	Частота виявлення		
	Висока та помірна активність (n=40)	Низька та мінімальна активність (n=17)	Період клініко-лабораторної ремісії (n=3)
1. Синдром цитолізу:			
- АЛТ, > норми	40 (100,0)	17 (100,0)	0
- АСТ, > норми	40 (100,0)	17 (100,0)	0
2. Імунно-запальний:			
- загальний білок, > норми	23 (58,0)	7 (41,0)	0
- γ -глобуліни, > норми	33 (82,5)	15 (88,0)	2 (67,0)
- тимолова проба, > норми	36 (90,0)*	11 (65,0)	0
- IgG, > норми	25 (62,5)	9 (53,0)	0
- ШОЕ, > норми	18 (45,0)*	3 (18,0)	0
3. Холестазу:			
- білірубін, > норми	29 (72,5)*	5 (29,0)	0
- ЛФ, > норми	27 (67,5)	10 (59,0)	1(33,0)
- ГГТ, > норми	38 (95,0)	16 (94,0)	1(33,3)
4. Наявність діагностичного титру автоантитіл:			
- ANA	30 (75,0)	13 (76,0)	2(67,0)
- Anti-SMA	7 (17,5)	3 (18,0)	0
- Anti-LKM-1	2 (5,0)	0	0
- Серонегативний АГ	5 (12,5)	1 (6,0)	1 (33,0)
Примітка. * - відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між підгрупами з високою і помірною та низькою і мінімальною активністю АГ.			

В 32,0% (n=19) дітей з цирозом печінки, внаслідок АГ виявлено: порушення білково-синтетичної функції печінки, що проявлялось зниженням концентрації альбуміну в сироватці крові (<30 г/л) в 21,0% (n=4), зниженням

ПТІ (<70%) в 26,0% (n=5), а також наявністю гіпокоагуляційного синдрому, що характеризувався подовженням МНВ ($> 1,2$) в 84,0 % (n=16) та зростанням АЧТЧ (> 31 сек.) в 84,0% (n=16).

Як прояв гіперспленізму у дітей з ЦП внаслідок АГ в загальному аналізі крові: анемія у 53,0% (n=10), лейкопенія – 52,0% (n=10), тромбоцитопенія – 68,0% (n=13).

УЗД органів черевної порожнини із доплерографією судинної системи печінки мала різну сонографічну картину, залежно від активності та ступеня прогресування захворювання. Характерними були значні ехоструктурні зміни в печінці, паренхіма у вигляді «зоряного поля», за рахунок неоднорідності і підвищення ехогенності, наявність дрібних тубулярних структур та ущільнення глісонової капсули і міжсегментарних перегородок, зміни показників кровотоку в судинах системи портальної вени (Мал.3.2).



Рис.3.2 Ехоструктурні зміни в паренхімі печінки хворої 12 років (неоднорідність і підвищення ехогенності паренхіми, наявність дрібних тубулярних структур, ущільнення глісонової капсули та міжсегментарних перегородок).

У дітей з прогресуючим перебігом захворювання та розвитком цирозу печінки мали місце: дифузна неоднорідність ехогенності паренхіми печінки з точковими гіперехогенними структурами, дрібно вогнищевий характер дифузних змін, звивистість контурів печінки при ВЧ-скануванні, надлишок

сполучної тканини в міждольовій борозні. Ущільненість і нерівність глісонової капсули, ущільнення стінок судин печінки. Розширення портальної вени, фіброзні зміни по ходу судин системи портальної вени. При доплерометрії зміни кровотоку в печінкових венах та підвищення швидкісних показників в портальній вені (Мал.3.3).

Збільшення селезінки за даними УЗД мало місце у 62,0 % хворих. Варто зазначити, що при фізикальному обстеженні лише у 48,0% дітей селезінка виступала з під краю лівої реберної дуги, а при УЗД зафіксовано збільшення поперечних розмірів цього органу.

Ехографічні прояви портальної гіпертензії у вигляді розширення портальної вени мало місце у 89,0% (n=17), селезінкової - у 52,0% (n=10), звивистість селезінкової вени діагностовано у 26,0% (n=5) дітей, варикозне розширення вен стінок жовчного міхура в 16,0% (n=3) дитини з ЦП. Асцит мав місце у 26,0% (n=5) дітей.

Ехографічні ознаки цирозу печінки були у 28,0% (n=17) дітей, а його клініко-лабораторні прояви у 27,0%(n=16) хворих. З 45 дітей, яким проведено морфологічне дослідження ознаки ЦП були в 22,0% (n=10) випадків.



Рис.3.3 Дифузна неоднорідність ехогенності паренхіми печінки з точковими гіперехогенними структурами, дрібно вогнищевий характер дифузних змін, звивистість контурів печінки.

У 74,0% (n=14) дітей з проявами ПГ, під час проведення фіброезофагогастроскопії виявлено флекктазії стравоходу 1-3 ст. Портальна гастропатія мала місце у 58,0% (n=11) дітей з ЦП.

За результатами морфологічного дослідження біоптату печінки. встановлено, що в переважній більшості дітей, хворих на АГ, мав місце виразний фіброз печінки та початкові прояви цирозу (F3-4 METAVIR) - 67,0% (n=30). Морфологічні ознаки цирозу мали 22,0% (n=10) дітей. Помірну та високу гістологічну активність гепатиту 9-18 балів за Knodell діагностовано в 62,0% (n=28) пацієнтів. Варто зазначити, що усі діти з мінімальною та низькою активністю отримували глюкокортикоїди на попередньому етапі лікування, до проведення пункційної біопсії печінки. Детальний аналіз отриманих результатів наведений в окремому розділі.

Для характеристики частоти біохімічних проявів залежно від гістологічної активності гепатиту усіх дітей ми розділили на дві групи. До першої групи належали діти із високим та помірним індексом гістологічної активності (9-18 балів за Knodell), до другої - діти із низькою та мінімальною активністю (1-8 балів за Knodell) (Таблиця 3.5).

У дітей з мінімальною та низькою гістологічною активністю в печінці (n=17) за результатами біохімічного дослідження крові: підвищення рівня трансаміназ до 3 норм мало 35,0% (n=6), в межах 3-5 норм (низька біохімічна активність) спостерігалось в 24,0% (n=4), у 41,0% дітей мала місце висока активність (підвищення рівня трансаміназ більше 10 норм). У дітей з помірною та високою гістологічною активністю (n=28) мінімальне підвищення трансаміназ встановлено у 4,0% (n=1) випадків, низька активність - у 18,0 % (n=5), помірна - у 14,0 % (n=4) хворих, а у 64,0 % (n=18) спостерігалась висока біохімічна активність (>10 норм). Ступінь гістологічної активності (Knodell) і біохімічна активність запального процесу в печінці, за нашими даними, не є тотожними, а суттєво доповнюють один одного, про що свідчить той факт, що у 19,0 % дітей з високою гістологічною активністю мали місце підвищення рівнів трансаміназ до 5 норм.

Найвищі значення показників, що характеризують мезенхімально-запальний синдром були у групі дітей із ІГА > 9 балів за Knodell. Більш значне підвищення рівня загального білірубину, ГГТ, що характеризують холестатичний синдром мало місце в групі дітей з помірною та високою гістологічною активністю гепатиту (Таблиця 3.5).

Таблиця 3.5.

Біохімічні синдроми у дітей з АГ залежно від індексу гістологічної активності (ІГА) Knodell, (n=45), Me[UQ-LQ]

Показник	Частота виявлення	
	Висока та помірна активність, 9-18 балів (Knodell) (n=28)	Низька і мінімальна активність, 1-8 балів(Knodell) (n=17)
Синдром цитолізу:		
-АЛТ, Од/л	579,5 [47,59-1093]*	180 [102-714]
-АСТ, Од/л	384,5 [206-783]*	127 [69-503]
Імунно-запальний:		
-загальний білок, г/л	80,3 [72,4-85,7]	76,8 [71,8-83,4]
- γ-глобуліни, %	25,6 [19,5-33,8]	20 [16,1-22,9]
-тимолова проба, Од	10,4 [5,4-13,8]*	4,6 [3,6-6,9]
-IgG, г/л	14,7 [11,8-19,9]*	11,4 [9,9-13,1]
Синдром холестазу:		
- гіпербілірубінемія, мкмоль/л	26,8 [15,7-37,2]	19,3 [16-99]
-ЛФ, О/л	284 [203-361]	220[179-387]
-ГГТ, Од/л	98 [59-243]*	56 [42-94]
Примітка. *- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групами з високою та помірною та низькою і мінімальною гістологічною активністю АГ за критерієм Вілкоксона.		

Частота біохімічних синдромів найбільш повно представлена в групі дітей із високою та помірною активністю АГ. Проведений статистичний

аналіз виявив статистично достовірну різницю між порівнюваними групами за критерієм Вілкоксона за показниками цитолітичного (АЛТ, АСТ), холестатичного (ГГТ) та мезенхімально запального синдрому (тимолова проба та IgG) ($p < 0,05$).

Нами проведений аналіз частоти біохімічних проявів залежно від індексу фіброзу. Усіх дітей ми розділили на чотири групи за стадією METAVIR (Таблиця 3.6).

Таблиця 3.6.

Біохімічні синдроми у дітей з АГ залежно від гістологічного індексу фіброзу METAVIR, (n=45), Me[UQ-LQ].

Біохімічні синдроми	Індекс фіброзу METAVIR			
	F1(n=3)	F2(n=12)	F3(n=20)	F4(n=10)
Цитолізу:				
АЛТ, Од/л	1235 [199-1821]	802[435-1539]	378 [102-855]	201 [162-559]
АСТ, Од/л	829 [69-1394]	531[267-959]	207 [115-705]	174 [112-369]
Мезенхіально-запальний:				
заг. білок,г/л	77,1 [74-85,9]	78,4[71,9-84,5]	81,6 [74-86]	72,2 [67-84]
γ-глобулінів, %	18,5[16,1-18,9]*	20 [18-21]	25,6[17,7-30,5]	29,8 [34,5-36,9]
тим. проба,Од	3,2 [2-6]*	8,25 [5,6-10,5]	5,4 [3,9-15,5]	11,2 [9-13,5]
IgG, г/л	11,1[9,9-17,6]	11,2[9,7-13,05]	13,6[10,8-17]	19,9[12,8-23,6]
холестазу:				
білірубін, мкмоль/л	43[30,5-168]	39 [19-120]	17,9 [15-36]	20,8[11,6-38,5]
ЛФ , О/л	260[99-390]	239[217-412]	283[181-358]	263[200-355]
ГГТ, Од/л	94 [55-187]	68 [37,5-146]	86 [56-169]	75 [55-219]
Примітка.*- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групою з стадією фіброзу F1 та F4.				

Проведений аналіз показав, що у групі дітей з стадією фіброзу F1-2 METAVIR більш виразними були прояви цитолітичного та холестатичного

синдромів, в той час як у дітей з стадію фіброзу F3-4 METAVIR рівень трансаміназ та маркерів холестазу знижується, а активність мезенхімально-запального синдрому зростає. У дітей з стадією фіброзу F4 METAVIR достовірно частіше мало місце підвищення тимолової проби та γ -глобулінів в порівнянні з дітьми з стадією фіброзу F1 METAVIR ($p < 0,05$). Наведені дані свідчать, що запальний процес відіграє ключову роль в прогресуванні фіброзу в печінці у дітей з АГ.

Узагальнюючи результати розділу можна зробити таке резюме:

1. АГ - автоімунне захворювання печінки, яким хворіють переважно дівчатка пре- та пубертатного віку, 68,0% проти 32,0% хлопців ($p < 0,005$). У більшості - 63,0 % пацієнтів захворювання маніфестувало в весняно-літній період ($p = 0,0035$), що може свідчити про роль надмірної інсоляції, як тригерного фактору автоімунних реакцій.

2. В родинях у 30,0 % дітей з АГ у родичів першого порядку мала місце автоімунна патологія: автоімунний тиреоїдит – у 44,0% випадків, ревматоїдний артрит – у 33,0%, бронхіальна астма – у 6,0 %, цукровий діабет першого типу – у 17,0 %.

3. У дітей переважає АГ I типу, (80,0 %) , в той час як АГ II типу встановлено лише у 3,0 % обстежених, серонегативний варіант АГ мали 12,0% обстежених.

4. Клінічна картина маніфестації хвороби неспецифічна і у більшості хворих подібна до гострого гепатиту та визначалась ступенем порушення функціонального стану печінки і була максимально представленою у хворих з високо та помірно активним перебігом АГ. Основними клінічними симптомами АГ є інтоксикаційний, гепатоспленомегалія та позапечінкові прояви, а біохімічними – імунно-запальний та синдром цитолізу.

5. Синдром цитолізу, мав місце у 95,0 % обстежених. У трьох дітей (5,0%), які перебували в періоді неповної клініко-лабораторної ремісії, спостерігались нормальні рівні трансаміназ крові. Мезенхімально-запальний

синдром в переважній більшості хворих характеризувався підвищенням рівня γ -глобулінів (83,0%), тимолової проби (78,0%), та IgG (57,0%).

6. В 32,0% дітей з цирозом печінки виявлено: порушення білково-синтетичної функції печінки, що проявлялось зниженням концентрації альбуміну в сироватці крові в 21,0%, зниженням ПТІ в 26,0%, а також наявністю гіпокоагуляційного синдрому, що характеризувався подовженням МНО в 84,0 % та зростанням АЧТЧ в 84,0%.

7. Ступінь гістологічної активності (Knodell) і біохімічна активність запального процесу в печінці, за нашими даними, не є тотожними, так у 19,0 % дітей з високою гістологічною активністю мало місце підвищення рівнів трансаміназ до 5 норм.

8. За результатами морфологічного дослідження біоптату печінки. встановлено, що в переважній більшості дітей, хворих на АГ, мав місце виразний фіброз печінки та початкові прояви цирозу (F3-4 METAVIR) - 67,0% (n=30). Морфологічні ознаки цирозу мали 22,0% (n=10) дітей. Помірну та високу гістологічну активність гепатиту 9-18 балів за Knodell діагностовано в 62,0% (n=28) пацієнтів.

9. У групі дітей з стадією фіброзу F1-2 METAVIR переважають прояви цитолітичного та холестатичного синдромів, в той час як у дітей з стадією фіброзу F3-4 METAVIR рівень трансаміназ та маркерів холестази знижується, а активність мезенхімально-запального синдрому зростає.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Березенко В.С., Михайлюк Х. З. Особливості маніфестації автоімунного гепатиту у дітей. *Сучасна педіатрія*. 2017.6(86). С. 80-87. (Особистий внесок - здобувач здійснила пошук літературних даних, самостійно забезпечила відбір, обстеження та лікування хворих; обробку, аналіз та узагальнення отриманих результаті та підготовку матеріалу до друку).

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ВІТАМІНОМ D ДІТЕЙ З
АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ

За нашими даними середній рівень концентрації вітаміну D в сироватці крові у дітей з автоімунним гепатитом складав 16,3 [11,5–22,1] нг/мл та знаходився в полі дефіциту. Серед обстежених 15,0% (n=9) дітей мали оптимальний рівень вітаміну D, недостатність встановлена у 17,0% (n=10) хворих, а дефіцит – у 68,0,0% (n=41) дітей (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Забезпеченість вітаміном D дітей з автоімунним гепатитом (n=60),%.

Варто зазначити, що середня концентрація 25(OH)D в сироватці крові не відрізнялась у представників обох статей та складала у дівчат - 17[11,2-22,31] нг/мл, у хлопців -15,6 [12,13-22]нг/мл і знаходились в зоні дефіциту. Для детальнішого аналізу, ми розділили усіх хворих на дві групи і три вікові підгрупи (Таблиця 4.1). Аналіз даних показав, що найнижчий рівень вітаміну D спостерігався у дівчат 10 - 18 років, та у хлопців 5-18 років. Ми не встановили вірогідної відмінності рівня 25(OH)D у сироватці крові між віковими підгрупами ($p > 0,05$). У переважної більшості дітей з АГ концентрація вітаміну D у сироватці крові знижена, а середні значення

25(OH)D знаходяться в зоні дефіцит і лише у віковій групі дівчат 2-5 років мала місце недостатність вітаміну D (таблиця 4.1).

Таблиця 4.1

Рівень вітаміну D у сироватці крові дітей залежно від віку, n=60, абс.ч.%

Рівень забезпеченості вітаміном D, нг/мл	Вікові групи					
	Хлопці 2-5 n=3	Дівчата 2-5 n=2	Хлопці 6-11 n=4	Дівчата 6-11 n=14	Хлопці 11-18 n=12	Дівчата 11-18 n=25
Середній рівень	19 [18,3-60,6]	22,5 [15,0-30]	12,7 [9,87-25,8]	19,11 [14,0-22,9]	15,3 [10,5-21,5]	15,17 [10,8-20]
Дефіцит	2(67,0)	1 (50,0)	3 (75,0)	9 (64,0)	8 (67,0)	19(76,0)
Недостатність	-	-	-	2(14,0)	3(25,0)	3(12,0)
Оптимальний рівень	1(33,0)	1(50,0)	1(25,0)	3(22,0)	1(8,0)	3 (12,0)

Враховуючи той факт, що регіон проживання та пора року впливає на забезпеченість вітаміном D [74] ми вивчили забезпеченість вітаміном D дітей з АГ залежно від цих факторів. Встановлено, що на всій території України в досліджуваних групах дітей мав місце дефіцит вітаміну D без статистично достовірної різниці ($p>0,05$). Так частка дефіциту 25(OH)D у сироватці крові дітей з АГ західного регіону складала 64,0%, східного – 60,0%, центрального – 78,0%, північного – 72,0%, південного – 80,0% (Таблиця 4.2, Рисунок 4.2).

Таблиця 4.2

Забезпеченість вітаміном D дітей з автоімунним гепатитом залежно від регіону проживання, абс. (%), Me [UQ–LQ].

Рівень забезпеченості вітаміном D, нг/мл	Регіон проживання				
	північний (n=7)	південний (n=10)	західний (n=14)	східний (n=10)	центральний (n=18)
1	2	3	4	5	6
Середні значення	19,0 [10,8–22,9]	15,3 [9,7–19]	16,7 [10,8–30,4]	18,3 [11,8–22,7]	15,1 [12,9–19,8]

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4	5	6
Дефіцит	5 (72,0)	8 (80,0)	9 (64,0)	6(60,0)	14 (78,0)
Недостатність	2 (28,0)	1 (10,0)	1(7,0)	2(20,0)	2 (11,0)
Оптимальний рівень	-	1 (10,0)	4 (29,0)	2(20,0)	2 (11,0)

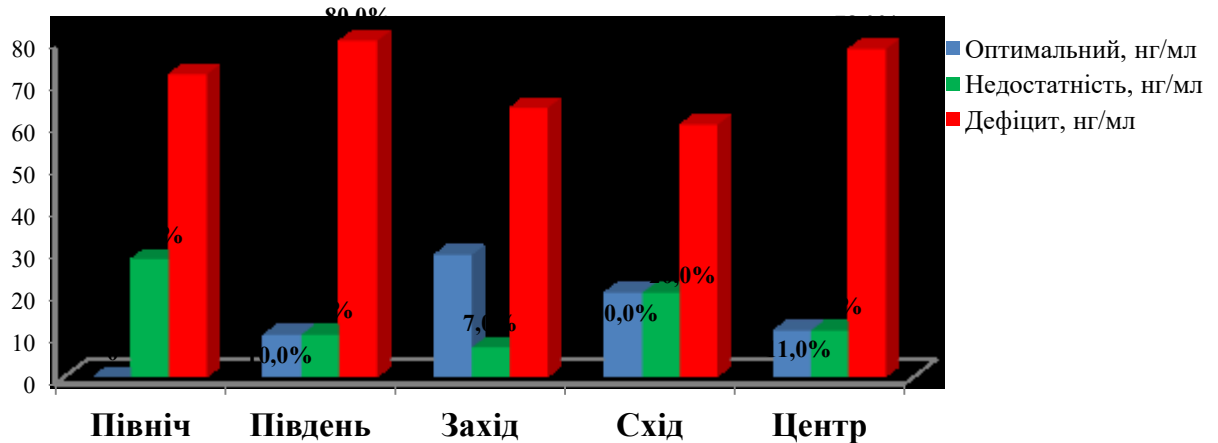


Рис.4.2. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей з АГ залежно від регіону проживання,(%).

Оцінка впливу сезонного чинника на концентрацію 25(OH)D у сироватці крові дітей з АГ показала, що середній рівень вітаміну D знаходився в зоні дефіциту незалежно від пори року. Так, узимку середній рівень вітаміну D складав 12,5[8,2-18,9] нг/мл, навесні – 15,5[10,8-30,0] нг/мл, влітку 18,6 [14,0-19,3] нг/мл і восени –17,5[11,8-26,8] нг/мл (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Забезпеченість вітаміном D дітей з автоімунним гепатитом залежно від пори року, абс. (%), Me [UQ–LQ]

Рівень вітаміну D, нг/мл	Пора року			
	Зима (n=4)	Весна (n=24)	Літо (n=14)	Осінь (n=18)
Середні значення	12,5 [8,2–18,9]	15,5 [10,8–30,0]	18,6 [14,0-19,3]	17,5 [11,8-26,8]
Дефіцит	3 (75,0)	17 (70,0)	12(85,0)	10(55,0)
Недостатність	1 (25,0)	1 (5,0)	2(15,0)	5(28,0)
Оптимальний рівень	-	6 (25,0)	-	3(17,0)

Ми не встановили статистично достовірної різниці в забезпеченості вітаміном D хворих на АГ залежно від пори року ($p>0,05$). Незважаючи на відсутність достовірної відмінності, найнижчий рівень концентрації 25(OH)D у сироватці крові спостерігався взимку та навесні. Частка дефіциту вітаміну D навесні у дітей з АГ складала 70,0%, влітку – 85,0%, взимку 75,0% та 55,0% восени ($p>0,05$). Недостатність вітаміну D взимку мала місце у 25,0%, навесні – у 5,0%, влітку – у 15,0% та у 28,0% восени серед обстежених дітей. Найнижчий рівень дефіциту в обстежених дітей був восени, і складав 55,0%, що підтверджує роль інсоляції в забезпеченості вітаміном D (рис. 4.3). Оптимальний рівень вітаміну D спостерігався лише у 25,0% дітей навесні та у 17,0% восени (рисунок 4.3).

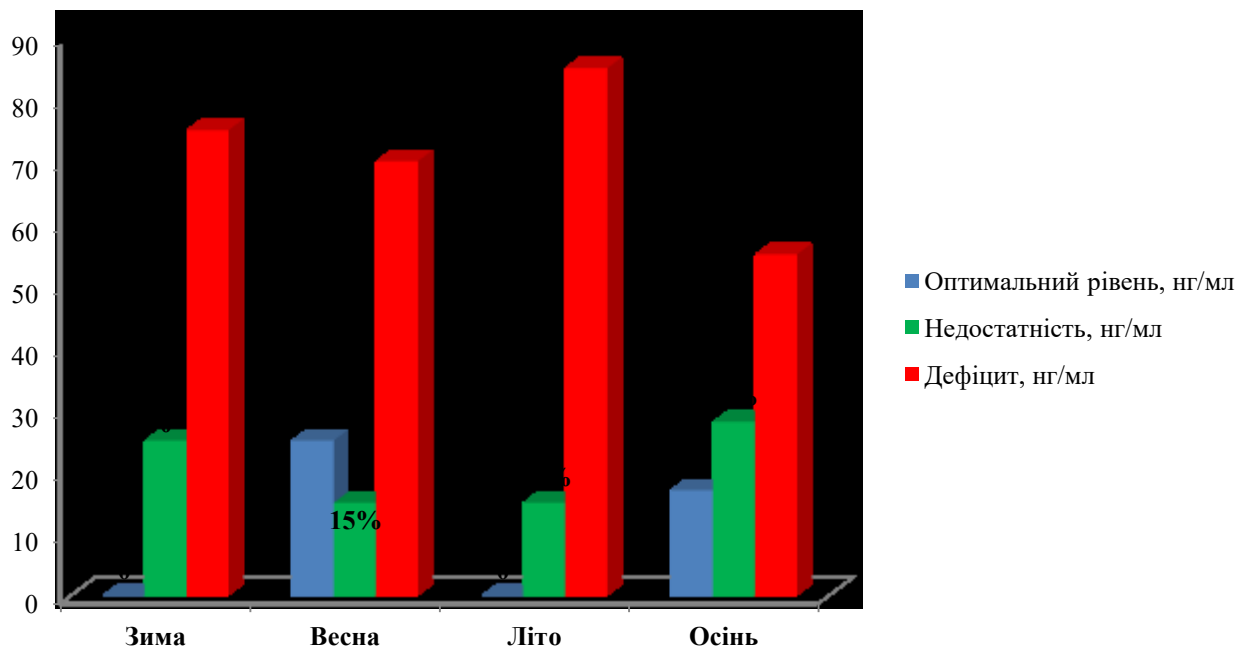


Рис. 4.3. Забезпеченість вітаміном D дітей з аутоімунним гепатитом залежно від пори року, %.

Проведено аналіз забезпеченості вітаміном D дітей які проживають у сільській місцевості та у місті, проте цей показник між групами достовірно не відрізнявся ($p>0,05$).

Аналіз добового раціону, обстежених нами дітей показав, що усі діти з АГ не отримують рекомендованої вікової норми кількості кальцію із

харчуванням на 30-40,0%. За нашими даними забезпеченість вітаміном D не впливала на представленість та виразність клінічних симптомів АГ у обстежених дітей. Ми не встановили достовірної відмінності в забезпеченості вітаміном D між групами дітей залежно від біохімічної активності гепатиту ($p > 0,05$).

Достовірної інформації про прийом вітаміну D на першому році життя батьки не надали, у зв'язку з чим неможливо провести аналіз впливу дотації вітаміну D на першому році життя на показник концентрації 25(OH)D в подальшому.

Клінічна картина в усіх обстежених дітей характеризувалась проявами астено-вегетативного синдрому (підвищена втомлюваність, емоційна лабільність, тощо), диспепсичного синдрому у вигляді зниження апетиту, нудоти, блювоти, метеоризму, порушення стільця діагностовано у 67,0% хворих. Помірний больовий абдомінальний синдром, мав місце у 42,0% ($n=25$) дітей (див. розділ 3). Забезпеченість вітаміном D не впливала особливості клінічного перебігу автоімунного гепатиту у дітей ($p > 0,05$).

Проведено дослідження забезпеченості вітаміном D від біохімічної, гістологічної активності та від стадії фіброзу за METAVIR.

Аналіз забезпеченості вітаміном D залежно від біохімічної активності гепатиту показав, що медіана концентрації вітаміну D в період ремісії АГ складала 22,76[8,48–18,46]нг/мл, у дітей з мінімальною активністю – 18,8[10,9-28,4] нг/мл, з низькою активністю – 13[7,2–19]нг/мл, помірною – 15,5[11,8-22] нг/мл, з високою активністю гепатиту– 18,3 [12,9–21,7] нг/мл. Таким чином, лише в період клініко-лабораторної ремісії рівень вітаміну D знаходився в зоні недостатності. Ми не виявили достовірної різниці в забезпеченості вітаміном D між групами дітей залежно від біохімічної активності гепатиту ($p > 0,05$) (таблиця 4.4, рисунок 4.4).

Таблиця 4.4.

Особливості забезпеченості вітаміном D дітей з АГ залежно від біохімічної активності, n=60, абс. числа (%).

Рівень вітаміну D, нг/мл	Біохімічна активність				
	Клініко-лабораторна ремісія (n=3)	Мінімальна (n=8)	Низька (n=9)	Помірна (n=7)	Висока (n=33)
Оптимальний рівень	1(33,0)	2 (25,0)	1 (11,0)	-	5 (15,0)
Недостатність	1 (33,0)	1(12,5)	-	2 (29,0)	5 (15,0)
Дефіцит	1 (33,0)	5 (62,5)	8 (89,0)	5 (71,0)	21 (70,0)

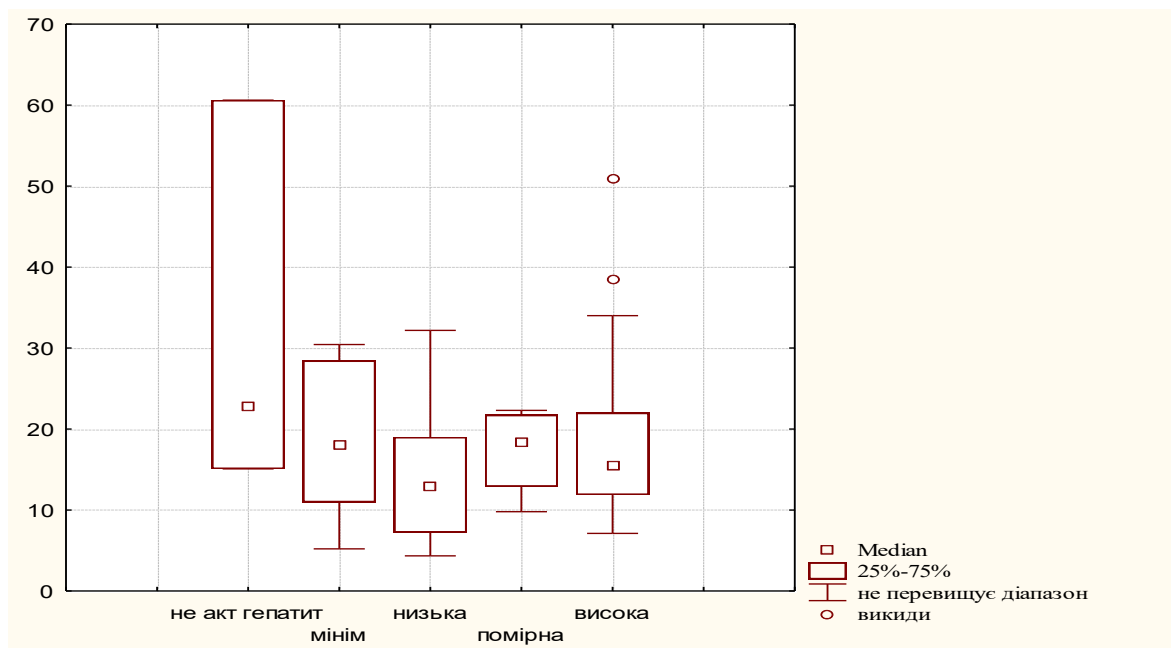


Рис. 4.4. Забезпеченість вітаміном D дітей з АГ, залежно від біохімічної активності гепатиту, n=60, Me [UQ–LQ].

За результатами морфологічного дослідження біоптату печінки встановлено, що у 67,0 % обстежених дітей мав місце виразний фіброз печінки F3-4 за METAVIR, та у 62,0% помірна активність гепатиту (ІГА >9 балів за Knodell). Значення медіани концентрації 25(OH)D в групах дітей з різною гістологічною активністю та стадією фіброзу наведені в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5.

Концентрація 25(OH)D у дітей з АГ залежно від стадії фіброзу METAVIR та гістологічної активності Knodell, абс.числа (%), Me [UQ–LQ], нг/мл.

Ознаки	АГ (n = 45)	25(OH)D, нг/мл, Me [UQ–LQ]
Індекс гістологічної активності Knodell:		
1-3 бали (мінімальна)	12 (27,0)	16,7[12,5-28,4]
4-8 бали (низька)	5 (11,0)	19,2[10,8-30,9]
9-12 бали (помірна)	11 (24,0)	12,6[7,11-22]
13-18 бали (висока)	17 (38,0)	15,5 [10,8-21]
Гістологічний індекс фіброзу METAVIR:		
F1	3 (7,0)	22[21-32,1]
F2	12(27,0)	13,4[11,3-32]
F3	20 (44,0)	16,2[11-20,3]
F4	10 (22,0)	12,9[10-19,2]

Аналіз забезпеченості вітаміном D у хворих з різною стадією фіброзу за даними морфологічного дослідження показав, що у дітей з стадією фіброзу F2 за METAVIR частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 67%, з стадією фіброзу F3- 75%, а у пацієнтів з цирозом печінки – 90,0% ($p>0,05$) (таблиця 4.6)

Таблиця 4.6.

Забезпеченість вітаміном D дітей з АГ залежно від стадії фіброзу печінки (за METAVIR), n=45, абс. ч.,%

Стадія фіброзу METAVIR	Рівень вітаміну D		
	Оптимальний рівень	Недостатність	Дефіцит
F1(n=3)	1(33,0)	2(67,0)	0
F2 (n=12)	4 (33,0)	0	8(67,0)
F3 (n=20)	2 (10,0)	3(15,0)	15(75,0)
F4 (n=10)	0	1(10,0)	9 (90,0)

Забезпеченість вітаміном D залежала від гістологічної активності автоімунного гепатиту. За нашими даними, у хворих з ІГА < 9 балів частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 25,0% (n=7), а у пацієнтів з ІГА > 9 балів - 75,0% (n=21) ($\chi^2=5,1$; $p=0,023$) (рис. 4.5).

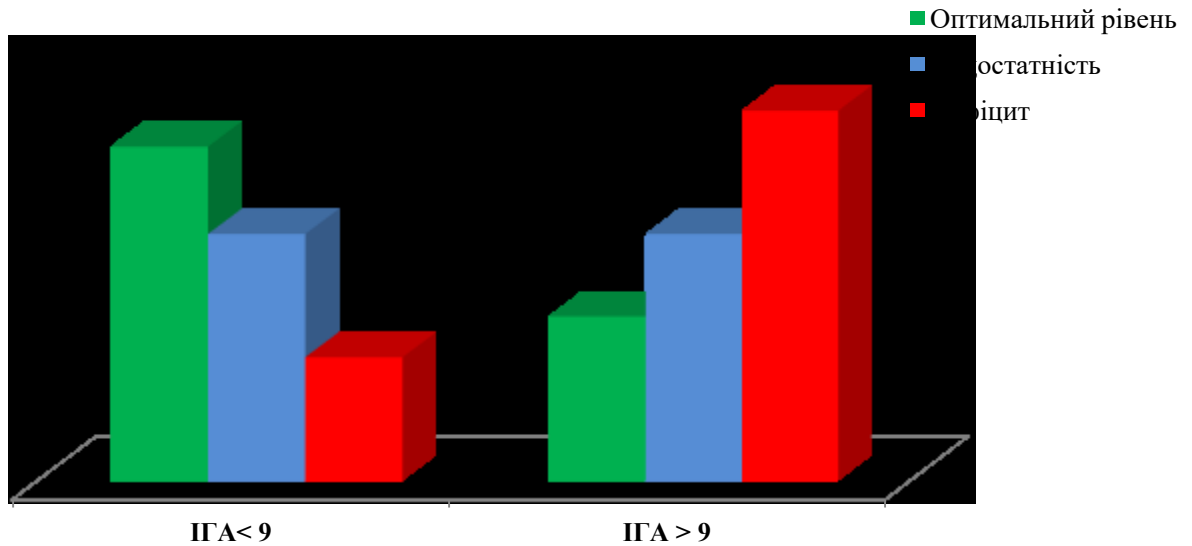


Рис. 4.5 Забезпеченість 25(OH)D дітей з АГ залежно від гістологічної активності за Knodell, n=45, %.

Примітка. * - відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групами дітей з ІГА < 9 балів та ІГА > 9 балів

У дітей з цирозом печінки (ЦП) – 32,0% (n=19) – середня концентрація вітаміну D складала 15,6 [10–19,2] нг/мл. У жодної дитини цієї групи не було оптимального рівня вітаміну D, тоді як частота дефіциту складала 89,0% (n=17), недостатність вітаміну D мала місце у 10,0% (n=2) цих хворих. Середній рівень вітаміну D у групі дітей без проявів ЦП – 68,0% (n=41) – складав 17 [12,1–23,1] нг/мл. Оптимальний рівень вітаміну D у даній групі мав місце у 20,0% (n=8) дітей, недостатність – у 17,0% (n=7), дефіцит – у 63,0% (n=26) обстежених (Таблиця 4.7).

Дефіцит вітаміну D достовірно частіше мав місце в групі дітей з проявами цирозу печінки ($\chi^2= 4,74$; $p=0,003$ між групою дітей з ЦП та без ЦП) (Таблиця 4.7, Рис.4.6, 4.7).

Таблиця 4.7.

Забезпеченість вітаміном D в групах дітей з цирозом та без цирозу печінки, абс., %, Me [UQ-LQ]

Рівень вітаміну D, нг/мл	Хворі із ЦП (n=19)			Хворі на АГ без ЦП (n=41)		
	абс.ч	%	Середній рівень Me [UQ-LQ]	абс.ч	%	Середній рівень Me [UQ-LQ]
Дефіцит	17	89,0	15,6 [10-19,2]	26	63,0	17 [12,1-23,1]*
Недостатність	2	11,0		7	17,0	
Оптимальний рівень	-	-		8	20,0	

Примітка.*- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групою дітей з ЦП

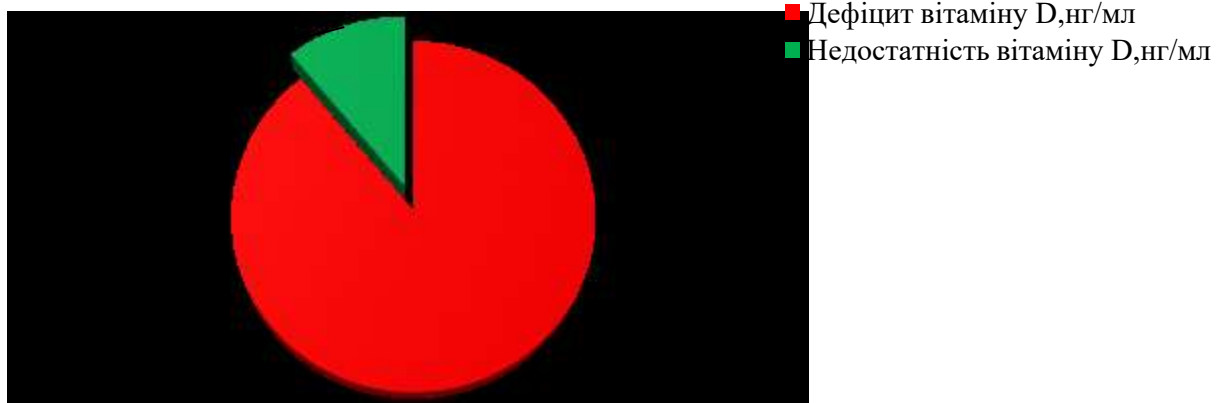


Рис. 4.6. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей з ЦП, %.

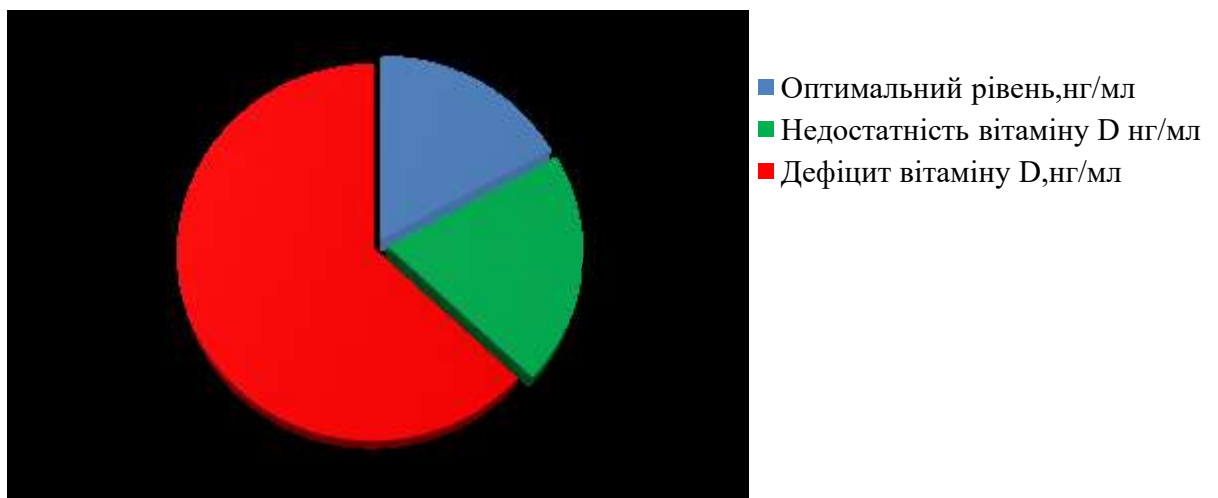


Рис. 4.7. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей без ЦП, %.

Узагальнюючи результати розділу можна зробити такі резюме:

1. Дві третини дітей (68,0%) з АГ мають дефіцит вітаміну D, який не залежить від пори року та регіону проживання. Найнижчий рівень вітаміну D спостерігається у дівчат 10-18 та у хлопців 5-18 років, однак без достовірної відмінності.

2. Незважаючи на відсутність вірогідних відмінностей, найнижчий рівень концентрації 25(OH)D у сироватці крові у дітей з АГ, спостерігався взимку та навесні. Найменша частка дітей з дефіцитом вітаміну D (55,0%), серед обстежених дітей була восени, що свідчить на користь впливу інсоляції на концентрацію 25(OH)D в сироватці крові.

3. Забезпеченість вітаміном D не впливала особливості клінічного перебігу автоімунного гепатиту у дітей ($p > 0,05$).

5. Аналіз забезпеченості вітаміном D залежно від біохімічної активності гепатиту показав, лише в період клініко-лабораторної ремісії рівень вітаміну D знаходився в зоні недостатності. Ми не виявили достовірної різниці в забезпеченості вітаміном D між групами дітей залежно від біохімічної активності гепатиту ($p > 0,05$).

6. Забезпеченість вітаміном D залежала від гістологічної активності автоімунного гепатиту. За нашими даними, у хворих з ІГА < 9 балів частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 25,0% , а у пацієнтів з ІГА > 9 балів - 75,0% ($p=0,023$)

7. Дефіцит вітаміну D достовірно частіше мав місце в групі дітей з проявами цирозу печінки У жодної дитини цієї групи не встановлено оптимального рівня вітаміну D, тоді як частота дефіциту складала 89,0%, а недостатності - 11,0%.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Березенко В.С. Михайлюк Х.З. Диба М.Б. Палкін А.Ю. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей хворих на автоімунний гепатит. Актуальні

проблеми педіатрії. Матеріали XIII з'їзду педіатрів України (11-13 жовтня 2016 р., м. Київ). *Міжнародний журнал педіатрії акушерства та гінекології*. липень/серпень 2016.Т.10.№. С.25-26. (Особистий внесок - дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлено тези до друку).

2. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Шадрін В.О., Крат В.В. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей з автоімунним гепатитом. *Перинатологія та педіатрія*. 2018. 1(73). С.92-97.(Особистий внесок - здобувач провела огляд літератури, відбір пацієнтів; обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів та підготовку матеріалу до друку).

3. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Диба М.Б., Крат В.В. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей, хворих на автоімунний гепатит. Матеріали Українсько-білоруської міжнародної конференції «Дефіцит и недостаточность витамина D в клинической практике» (г. Чернигов, Україна). *Bol', sustavy, pozvonočnik*. 2017.7(4):200-205. doi:10.22141/2224-07.7.4.2017.121233. (Особистий внесок - дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлено тези до друку).

РОЗДІЛ 5

**ОСОБЛИВОСТІ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА РЕЦЕПТОРА *VDR*
(*ApaI*, *TagI*, *BsmI*) У ДІТЕЙ З АВТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ**

При проведенні пошуку результатів наукових досліджень в PubMed, EMBASE, Cochrane Library нами не виявлено досліджень щодо зв'язку між поліморфними варіантами гена рецептора *VDR* із ризиком розвитку чи особливостями перебігу АГ у дітей. Проведені лише поодинокі дослідження в цьому напрямку у дорослих.

Дослідження виконано у 51 дитини. Серед обстежених переважали дівчата - 61,0%, хлопців було - 39,0%. Середній вік хворих на момент дослідження складав 11[8-15] років, що відповідає даним літератури [51]. Проведений аналіз не виявив достовірної різниці в розподілі частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів *ApaI*, *TagI*, *BsmI* гена рецептора *VDR* за статтю у дітей з автоімунним гепатитом ($p > 0,05$) (Таблиця 5.1).

Таблиця 5.1

Розподіл частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів *ApaI*, *TagI*, *BsmI* гена рецептора *VDR* у дітей з автоімунним гепатитом залежно від статі, абс.ч., %.

Хлопці (n=17)								
<i>ApaI</i> (A/C)			<i>TagI</i> /Crs 731236			<i>BsmI</i> G/Ars 1544410		
Генотип	n	%	Генотип	n	%	Генотип	n	%
AA	7	41,0	TT	6	35,0	GG	6	35,0
AC	9	53,0	TC	7	41,0	GA	7	41,0
CC	1	6,0	CC	4	24,0	AA	4	24,0
A Allele	23	67,0	T allele	19	56,0	G allele	19	56,0
C allele	11	33,0	C allele	15	44,0	A allele	15	44,0
Дівчата (n=34)								
<i>ApaI</i> (A/C)			<i>TagI</i> T/C rs 731236			<i>BsmI</i> G/A rs 1544410		
Генотип	n	%	Генотип	n	%	Генотип	n	%
AA	9	26,0	TT	15	44,0	GG	14	41,0
AC	17	50,0	TC	15	44,0	GA	11	32,0
CC	8	24,0	CC	4	12,0	AA	9	27,0
A Allele	35	51,0	T allele	45	66,0	G allele	39	57,0
C allele	33	49,0	C allele	23	34,0	A allele	29	43,0

Ми провели аналіз впливу розподілу частота алелей і генотипів поліморфних варіантів AраI, TagI, BsmI гену рецептора VDR в обстежених нами дітей, хворих на АГ. Результати виявлених особливостей розподілу наведено в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Розподіл частота алелей і генотипів поліморфних варіантів AраI, TagI, BsmI гена рецептора VDR у дітей з автоімунним гепатитом, абс.ч., %.

AраI (A/C)			TagIT/Crs 731236			BsmIG/Ars 1544410		
Генотип	n	%	Генотип	n	%	Генотип	n	%
AA	16	31,0	TT	21	41,0	GG	20	40,0
AC	26	51,0	TC	22	43,0	GA	15	29,0
CC	9	18,0	CC	8	16,0	AA	16	31,0
A Allele	58	57,0	T allele	64	63,0	G allele	55	54,0
C allele	44	43,0	C allele	48	37,0	A allele	47	46,0

У 72,0%(n=36) обстежених хворих мав місце виразний фіброз печінки F 3-4 METAVIR, у 34,0% з них (n=17) дітей мали ознаки цирозу печінки. Розподіл дітей за стадією фіброзу наведений на рисунку 5.1.

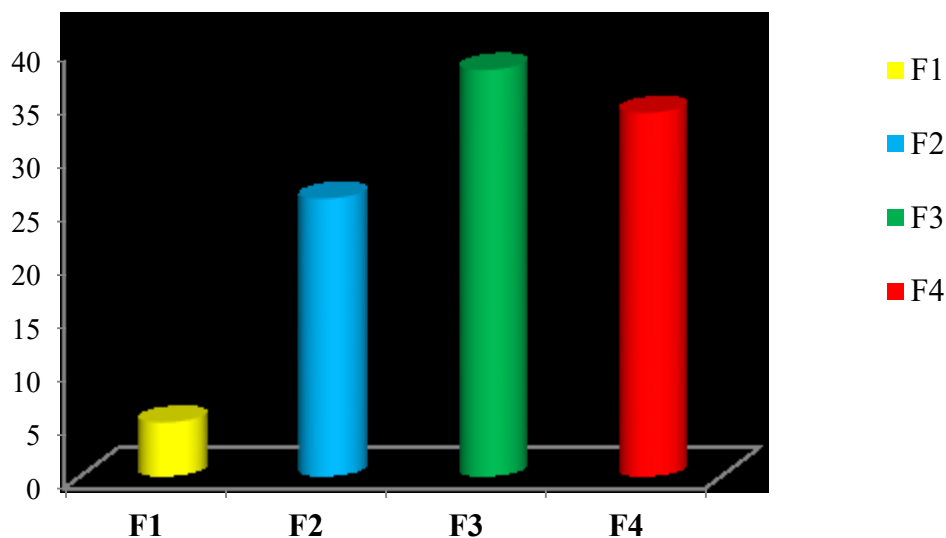


Рис.5.1. Розподіл дітей з АГ за стадією фіброзу, (%)

Середній рівень концентрації вітаміну D у обстежених дітей складав $16,3[10,9-22]$ нг/мл і знаходився в зоні дефіциту. Особливості забезпеченості вітаміном D даної групи хворих на автоімунний гепатит залежно від стадії фіброзу наведені в таблиці 5.3.

Враховуючи меншу кількість пацієнтів, включених в дослідження в даному розділі, ми провели аналіз забезпеченості вітаміном D в даній групі пацієнтів. Оптимальний рівень вітаміну D мали 12,0% (n=6), недостатність- 15,5 % (n=8), дефіцит діагностовано в 72,5% (n=37) дітей, що підтверджує результати аналізу наведеного в розділі 4. Ми встановили, що у цих хворих рівень забезпеченості вітаміном D залежав від стадії фіброзу (рисунок 5.2).

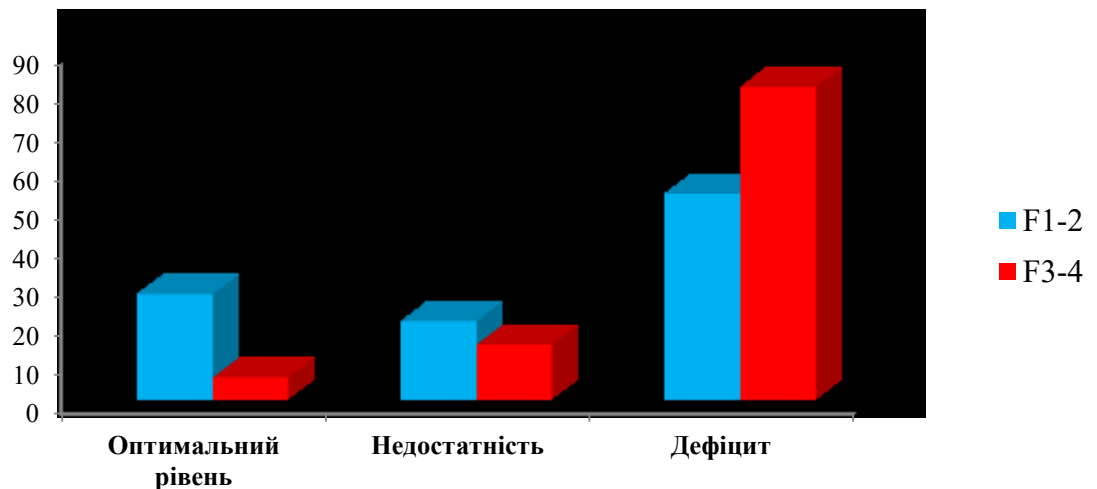


Рис. 5.2. Забезпеченість вітаміном D хворих на АГ, залежно від стадії фіброзу печінки, абс. ч., %.

Для проведення аналізу ми об'єднали підгрупи дітей із стадією фіброзу F1 та F2, а також F3 та F4.

За нашими даними діти з виразним фіброзом (F3-4 METAVIR) в цій групі, як і в загальній (див. розділ 4) також достовірно частіше мали дефіцит вітаміну D ($\chi^2= 5,21$; $p=0,022$) порівняно з дітьми з стадією фіброзу F1-2 METAVIR (Рисунок 5.2, Таблиця 5.3).

Таблиця 5.3

Особливості забезпеченості вітаміном D дітей хворих на автоімунний гепатит залежно від стадії фіброзу, абс. ч.,%.

Стадія фіброзу METAVIR, (n=51)	Рівень вітаміну D, абс.ч.,%		
	Оптимальний рівень (n=6)	Недостатність (n=8)	Дефіцит (n=37)
F1-2 (n=15)	4(27,0)	3(20,0)	8(53,0)*
F3- 4(n=36)	2(5,5)	5(14,0)	29(80,5)

Примітка. *- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між групою дітей з стадією фіброзу F1-2 та F 3-4.

Зв'язок генотипів поліморфних варіантів ApaI, BsmI, TagI гена рецептора *VDR* з стадією фіброзу у дітей хворих на автоімунний гепатит показав, що діти з виразним фіброзом F3-4 METAVIR достовірно частіше мали CC генотип за поліморфним варіантом TagI гена рецептора *VDR* ($\chi^2=3,953$; $p < 0,05$) порівняно з дітьми з стадією фіброзу F1-2 METAVIR (таблиця 5.4).

Таблиця 5.4

Розподіл дітей за поліморфним варіантом гена рецептора *VDR* ApaI, TagI, BsmI та стадією фіброзу METAVIR, абс.ч.,%.

Генотип генів	F1-F2(n=15)		F3-F4(n=36)	
	n	%	n	%
1	2	3	4	5
<i>VDR, ApaI</i>				
AA	3	20,0	13	36,0
AC	10	67,0	16	44,5
CC	2	13,0	7	19,5
A allele	16	53,0	42	58,0
C allele	14	47,0	30	42,0
<i>VDR, TagI</i>				
TT	7	47,0	14	39,0
TC	8	53,0	14	39,0

Продовження таблиці 5.4

1	2	3	4	5
CC	-	-	8	22,0*
T allele	22	73,0	42	58,0
C allele	8	27,0	30	42,0*
<i>VDR, BsmI</i>				
GG	6	40,0	14	39,0
GA	6	40,0	9	25,0
AA	3	20,0	13	36,0
G allele	18	60,0	37	51,0
A allele	12	40,0	35	49,0
Примітка *- відмінність вірогідна ($p < 0,05$).				

Аналіз зв'язку генотипів поліморфних варіантів *ApaI*, *BsmI*, *TagI* гена рецептора *VDR* з біохімічною активністю гепатиту у дітей хворих на автоімунний гепатит показав, що активність гепатиту не залежить від варіантів розподілу алелів і генотипів поліморфних варіантів *ApaI*, *TagI*, *BsmI* гена рецептора *VDR* (Таблиця 5.5).

Таблиця 5.5

Розподіл дітей за поліморфним варіантом гена рецептора *VDR* *ApaI*, *TagI*, *BsmI* залежно від активності гепатиту, абс.ч.,%.

Генотип	Неактивний		Мінімальна та низька		Помірна та висока	
	n	%	n	%	n	%
1	2	3	4	5	6	7
<i>VDR, ApaI</i>						
AA	1	6,25	5	31,25	10	62,5
AC	1	4,0	9	35,0	15	58,0
CC	-	-	2	22,0	7	78,0
A allele	3	75,0	19	59,0	35	55,0
C allele	1	25,0	13	41,0	29	45,0
<i>VDR, TagI</i>						
TT	1	5,0	6	28,0	14	67,0
TC	1	5,0	8	36,0	13	59,0
CC	1	12,5	2	25,0	5	62,5

Продовження таблиці 5.5

1	2	3	4	5	6	7
T allele	3	50,0	20	62,5	41	64,0
C allele	3	50,0	12	37,5	23	36,0
<i>VDR</i> , BsmI						
GG	-	-	6	30,0	14	70,0
GA	2	13,0	5	33,0	8	54,0
AA	1	6,25	5	31,25	10	62,5
G allele	2	33,0	17	53,0	36	56,0
A allele	4	67,0	15	47,0	28	44,0

У досліджуваній групі обстежених нами дітей було вивчено взаємозв'язок між рівнем 25(OH)D у сироватці крові та поліморфізмом гена *VDR*. Достовірної різниці в рівні забезпеченості вітаміном D залежно від досліджених генотипів не виявлено, окрім алельного варіанту BsmI. У дітей з генотипом GA за поліморфним варіантом BsmI відмічалось достовірне зниження рівня вітаміну D в сироватці крові ($12,44 \pm 5,51$) порівняно з генотипами AA($18,54 \pm 7,80$) та G($19,23 \pm 7,05$). За поліморфними варіантам TagI та ApaI гена рецептора *VDR* у дітей з АГ не встановлено достовірної різниці в концентрації 25(OH)D в сироватці крові (Таблиця 5.6, рис.5.3).

Таблиця 5.6

Концентрація 25(OH)D в сироватці крові у дітей з АГ з різними варіантами поліморфізму гена *VDR*, $M \pm m$, нг/мл (n=51).

Варіанти поліморфізму гену VDR	Концентрація 25(OH)D в сироватці крові (нг/мл)
1	2
ApaI:	
а) AA(n=16)	18,54±7,80
б) AC(n=26)	15,46±7,70
в) CC(n=9)	18,75±4,35
TagI:	
а) TT(n=21)	18,83±7,10
б) TC (n=22)	15,19±7,48
в) TC (n=22)	17,24±7,61

Продовження таблиці 5.6

1	2
BsmI:	
а) GG (n=20)	(19,23±7,05)*
б) GA (n=15)	12,44±5,51
в) AA (n=16)	(18,53±7,80)**

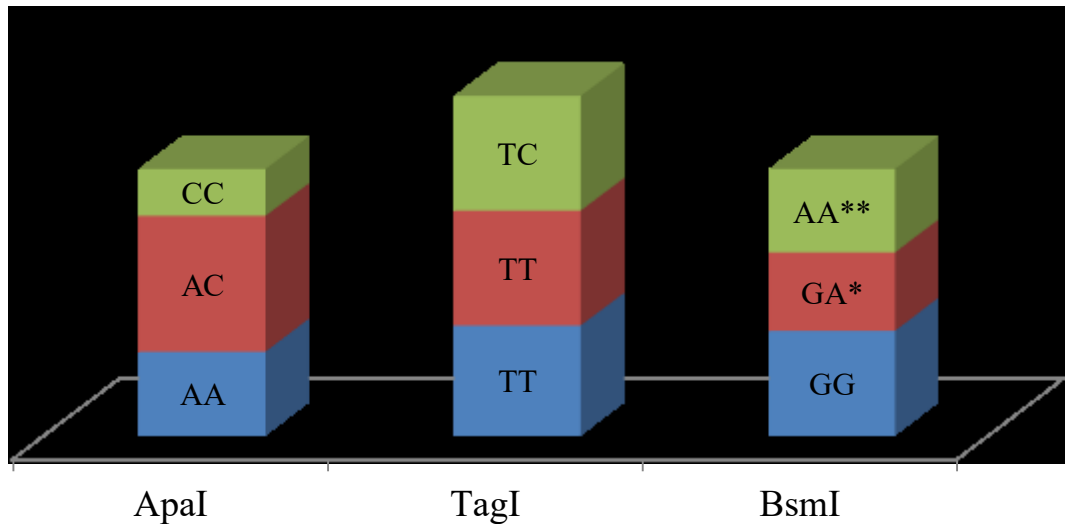


Рис.5.3. Розподіл генотипів поліморфних варіантів ApaI, TagI, BsmI гена VDR, залежно від рівня забезпеченості вітаміном D.

Примітки: *- $p < 0,05$ між поліморфним варіантом BsmI генотип GG та GA;

** - $p < 0,05$ між поліморфним варіантом BsmI генотип GA та AA.

Ми провели оцінку впливу на забезпеченість вітаміном D та прогресування автоімунного гепатиту комбінації за трьома алельними варіантами гена рецептора VDR (ApaI, TagI, BsmI). За результатами нашого дослідження серед обстежених пацієнтів ми виявили 81 комбінацію генотипів. Не було встановлено наступних комбінацій генотипів за трьома алельними варіантами гена: AA/TT/GG, AA/TT/GA, AA/TT/AA, AA/TC/GG, AA/TC/GA, AA/CC/GG, AA/CC/GA, AC/TC/GG, AC/TC/AA, AC/CC/GG, AC/CC/GA, AC/CC/AA, CC/TT/GA, CC/TT/AA, CC/TC/GG, CC/TC/AA, CC/TC/GA, CC/CC/GG, CC/CC/GA, CC/CC/GG. У обстежених пацієнтів було виявлено 7 наступних комбінацій генотипів: AA/TC/AA (n=8), AA/CC/AA

(n=8), AC/TT/GG (n=11), AC/TT/GA (n=1), AC/TC/GA (n=14), CC/TT/GG (n=9). Нами було проведено аналіз зв'язку між забезпеченістю вітаміном D та комбінацією генотипів за трьома алельними варіантами гена *VDR* (рисунок 5.4).

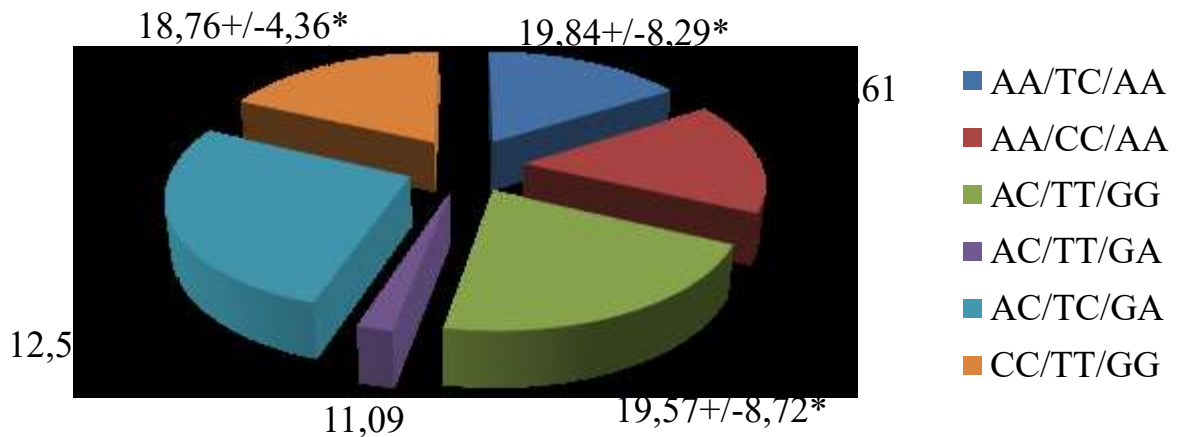


Рис. 5.4. Концентрація 25(OH)D в сироватці крові у дітей з АГ залежно від комбінацій генотипів за варіантами *ApaI*, *TagI*, *BsmI* гена рецептора *VDR*, абс.ч., $M \pm m$, нг/мл.

Примітка. *- відмінність вірогідна ($p < 0,05$)

Отримані результати показали, що діти із комбінацією генотипів AA/TC/AA, AC/TT/GG, CC/TT/GG достовірно частіше мали вищий рівень вітаміну D в сироватці крові порівняно із дітьми із комбінацією генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами *ApaI*, *TagI*, *BsmI* гена рецептора *VDR* ($p < 0,05$). Загалом усі обстежені діти мали різного ступеня виразності дефіцит вітаміну D. Найвищий рівень 25(OH)D було виявлено у дітей із комбінацією генотипів AA/TC/AA (19,84±8,29)нг/мл.

Ми провели аналіз взаємозв'язку комбінацій алельних варіантів гена рецептора *VDR* зі стадією фіброзу печінки у даного контингенту хворих. За нашими даними діти із комбінацією генотипів AA/CC/AA достовірно частіше мали виразний фіброзу F 3 та F4 METAVIR ($\chi^2 = 3,953$; $p < 0,05$) (Таблиця 5.7).

Таблиця 5.7

Розподіл дітей за стадією фіброзу печінки (за METAVIR) залежно від комбінацій алельних варіантів AраI, TagI, BsmI гена рецептора VDR, абс.ч.,%.

Комбінація алельних варіантів	Стадія фіброзу печінки (за METAVIR), (n=51)	
	F 1-2(n=15)	F 3-4(n=36)
AA/TC/AC	3(20,0)	5(14,0)
AA/CC/AA	-	8(22,0)*
AC/TT/GG	1(7,0)	-
AC/TT/GA	4(27,0)	7(19,5)
AC/TC/GA	5 (33,0)	9 (25,0)
CC/TT/GG	2 (13,0)	7 (19,5)

Примітка. *- відмінність вірогідна ($p < 0,05$).

Ми не встановили достовірно значущого взаємозв'язку між комбінаціями алельних варіантів гена рецептора VDR та активністю гепатиту за показниками трансаміназ ($p > 0,05$) (Таблиця 5.8).

Таблиця 5.8

Розподіл дітей за активністю гепатиту залежно від комбінацій алельних варіантів AраI, TagI, BsmI гена рецептора VDR, абс.ч.,%.

Комбінації алельних варіантів	Клініко-лабораторна ремісія (n=3)	Мінімальна і низька активність (n=15)	Помірна і висока активність (n=33)
AA/TC/AA	-	3(20,0)	5(15,0)
AA/CC/AA	1(33,3)	2(13,0)	5(15,0)
AC/TT/GG	1(33,3)	-	-
AC/TT/GA	-	3(20,0)	8(24,0)
AC/TC/GA	1(33,3)	5(33,0)	8(24,0)
CC/TT/GG	-	2(14,0)	7(22,0)

Узагальнюючи результати розділу можна зробити такі резюме:

1. Дефіцит вітаміну D у дітей з автоімунним гепатитом є асоційованим із наявністю генотипу GA за поліморфним варіантом BsmI гена рецептора VDR.

2. Діти із комбінацією генотипів AA/TC/AA, AC/TT/GG, CC/TT/GG достовірно частіше мали вищий рівень вітаміну D в сироватці крові порівняно із дітьми із комбінацією генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR ($p < 0,05$).

4. Генотип CC за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR та комбінації генотипів AA/CC/AA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена асоційовані із виразним фіброзом печінки у дітей хворих на автоімунний гепатит. Так хворі з фіброзом (F3-4 METAVIR) достовірно частіше мали CC генотип за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR ($p < 0,05$), та генотип AA/CC/AA за дослідженими алельними варіантами гена рецептора VDR ($p < 0,05$).

Результати досліджень даного розділу наведено в наступних публікаціях:

1. Berezenko V. S. Correlation of polymorphous variants (ApaI, TagI, BsmI) of the VDR receptor gene with the vitamin D level and liver fibrosis in children with autoimmune hepatitis/V. S. Berezenko, H. Z. Mykhailiuk, Z. I. Rossokha, S. P. Kyriachenko // Zaporozhye medical journal 2019; 21 (4), 458–465 DOI: 10.14739/2310-1210.2019.4.173196 - (Здобувач зібрала, проаналізувала матеріал, самостійно забезпечила підбір пацієнтів, обробку статистичних даних, аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовку до друку).

2. Березенко В.С. Зв'язок забезпеченості вітаміном D у дітей з автоімунним гепатитом з поліморфними варіантами (ApaI, TagI, BsmI) гена рецептора вітаміну D (VDR) /Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Диба М.Б., Крат В.В., Ткалик О.М. *Матеріали VIII Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України»* м.Київ, 17-19 квітня 2019р С.148 (Дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлені тези до друку).

РОЗДІЛ 6

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПЕЧІНКИ У ДІТЕЙ З АТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ НА ФОНІ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ ТЕРАПІЇ

6.1. Морфологічна та імуногістохімічна характеристика автоімунного гепатиту у дітей до лікування та на фоні імуносупресивної терапії

Гістологічне та імуногістохімічне дослідження біоптатів печінки проведено у 45 хворих на автоімунний гепатит. При гістологічному дослідженні біоптатів печінки оцінювались параметри змін структури печінки, гепатоцитів, синусоїдальних клітин, за розробленим в відділенні патоморфології ДУ «ІПАГ ім. акад. О.М.Лук'янової НАМН України» протоколом. Усі обстежені були розділені на 2 групи: до I групи увійшли діти, які на момент пункційної біопсії печінки не отримували імуносупресивного лікування (n=25), до II- діти (n=20), які отримували ГКС на попередніх етапах лікування, до проведення морфологічного дослідження печінки. Узагальнені дані морфологічного дослідження наведені в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Морфологічні та імуногістохімічні особливості біоптату печінки у дітей з автоімунним гепатитом, (n = 45), абс.ч.,%.

Ознаки	Виразність змін I групи (n=25)	Виразність змін II групи (n=20)
1	2	3
Стеатоз	0	0
Гідропічна дистрофія, 1 – 3 бали	20 (80,0 %)	13(65,0%)
Ацидофільні тільця Каунсильмена, 1 – 3 бали	13 (52,0 %)*	4 (20,0%)

Продовження таблиці 6.1

1	2	3
Активація синусоїдальних клітин, 1-3 бали	20 (80,0%)	10 (50,0 %)
“Капіляризація” синусоїдів 1-3 бали	20 (80,0 %)	15 (75,0 %)
Лімфо-плазмоцитарна інфільтрація з позитивною імуногістохімічною реакцією CD 138	25 (100,0%)*	10(50,0%)
Скупчення лімфоцитів «лімфоїдні фолікули»	13(52,0%)*	-
Гепатоцелюлярні розетки	22 (88,0)	4(20,0)
Стадія фіброзу, METAVIR:		
F 1,	-	3 (15,0)
F 2,	5 (20,0)	7 (35,0)
F 3,	13(52,0)	7 (35,0)
F 4.	7 (28,0)	3 (15,0)
Індекс гістологічної активності (ІГА) Knodell:		
1-3 бали (мінімальна)	1(4,0)	11(55,0)
4-8 бали (низька)	1 (4,0)	4 (20,0)
9-12 бали (помірна)	9 (36,0)	2 (10,0)
13-18 бали (висока)	14 (56,0)*	3(15,0)
Примітка. * - відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між I та II групами.		

За нашими даними у всіх обстежених виявлено дистрофію гепатоцитів (балонну, або білкову). Гістологічно гепатоцити відрізнялися за формою та об'ємом. Гідропічна дистрофія виявлена у переважної більшості дітей обох груп (таблиця 5.1), та виявлялась як в поодиноких клітинах та цілих групах клітин. Жирової дистрофії гепатоцитів не виявлено у жодної дитини з АГ.

В усіх біоптатах мало місце розширення портальних трактів та лімфо-макрофагальна та плазмоцитарна інфільтрація портальних трактів та

перипортальних зон. Виразність цієї інфільтрації визначала гістологічну активність запального процесу в печінці. Варто зазначити, що в I групі дітей достовірно частіше мала місце розповсюджена лімфо - плазмоцитарна інфільтрація портального тракту і перипортальної зони, а також виразна позитивна експресія маркера плазматичних клітин CD 138 (рис.6.3,6.4). В II групі дітей також діагностовано лімфо-плазмоцитарну інфільтрацію портального тракту і перипортальної зони, однак лише у 50,0% обстежених дітей були поодинокі маркери CD 138($\chi^2=16,07$; $p < 0,05$) (рис.6.6;6.7).

Скупчення лімфоцитів по типу „лімфоїдних фолікулів” мало місце в 52,0% дітей I групи та не виявлено в жодній дитини другої групи ($\chi^2=13,6$; $p < 0,05$) (рис.6.1).

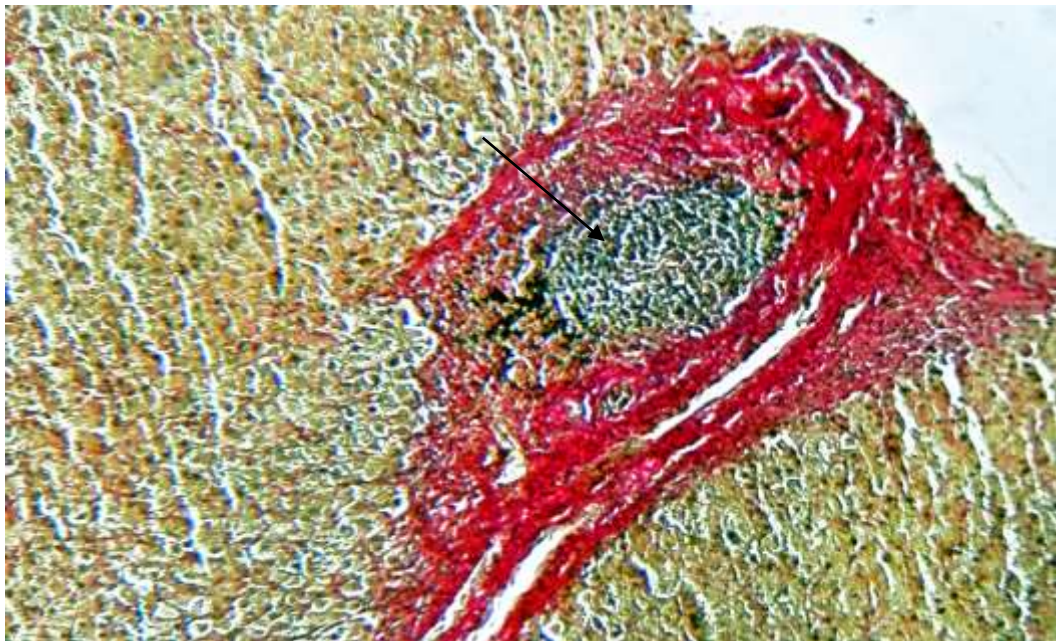


Рис.6.1. Біоптат печінки. Лімфоїдний фолікул в портальному тракті печінки у дитини 11 років до лікування АГ. Зabarвлення пікрофуксином за Ван Гізон. Мікрофотографія. Збільшення: 10×40 .

Ацидофільні тільця Каунсильмена, що характеризують заключний етап апоптозу, та являють собою гепатоцити у стані коагуляційного некрозу («муміфіковані гепатоцити»), як маркер апонекрозу, мають вигляд округлих утворень, з гомогенною еозинофільною цитоплазмою, в якій відсутнє ядро

або прослідковуються його залишки, виявлені у 52,0% дітей I групи та лише у 20,0% II групи ($\chi^2=6,7$; $p=0,01$) (рис 6.2).

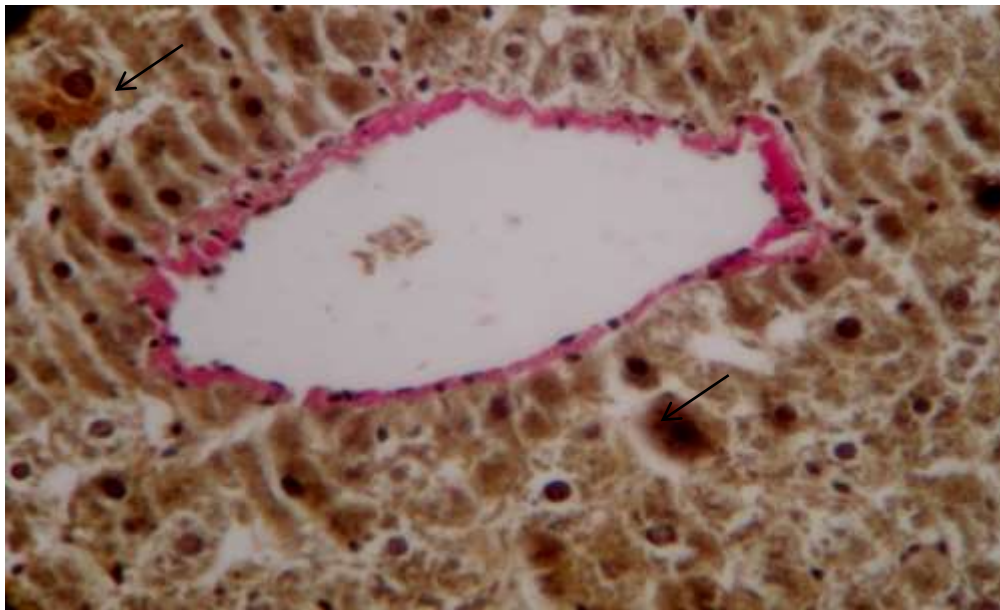


Рис. 6.2. Ацидофільні тільця Каунсильмена (пікнотичні ядра) поряд із потовщеною та фіброзованою центральною веною у дитини 8 років з АГ. Мікрофотографія. Збільшення: 10×40 .

«Капіляризація» синусоїдів, яка є достовірним гістологічним маркером гострого гепатиту, була виявлена у 78,% дітей. Вона характеризується посиленням синтезу компонентів сполучної тканини у просторі Діссе активованими пересинусоїдальними клітинами та зірчастими клітинами Іто, набуття ними скоротливої здатності з відповіддю на дію вазоконстрикторів із наступною їх частковою облітерацією та накопичення колагену і фібронектину в просторі Діссе і перисинусоїдах, що порушує дифузію поживних речовин із судин до клітин печінки [19].

Активація синусоїдальних клітин, яка є першою ланкою синтезу профіброгених та прозапальних цитокінів зустрічалась у 67,0% дітей з АГ.

Гепатоцелюлярні розетки, що являють собою невеликі групи гепатоцитів, розташованих навколо невеликого, іноді невидимого, центрального просвіту

мали місце в 80,0% хворих дітей І групи, та в 20,0% дітей ІІ групи ($\chi^2=16,07$; $p < 0,01$) (рис.6.3).

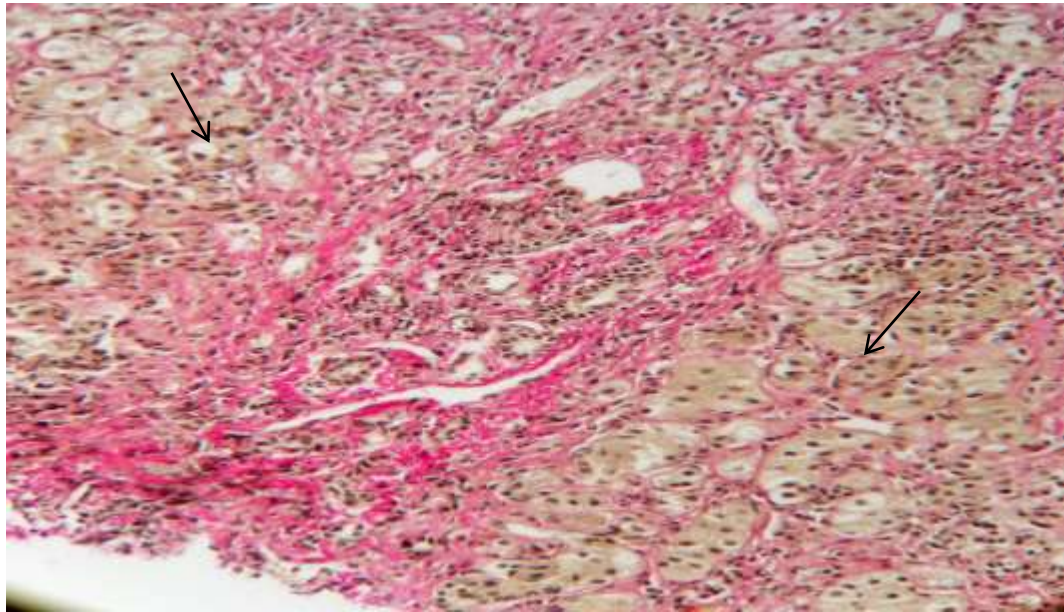


Рис. 6.3. Лімфо-плазмоцитарна інфільтрація портального тракту та перипортальної зони у дитини 10 років до лікування. Розеткоутворення. Мікрофотографія. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Збільшення: 10×40 .

У зв'язку з технічними труднощами при проведенні морфологічного дослідження, ми не оцінювали емперіоплез в обстежених групах.

Помірну та високу гістологічну активність гепатиту (ІГА >9 балів) діагностовано у 62,0 % хворих: у 82,0 % дітей І групи та 18,0 % дітей ІІ групи ($\chi^2=21,2$; $p<0,001$).

Виразний фіброз $>F2$ за METAVIR мали 67,0% ($n=30$) хворих. Цироз печінки за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки, у всіх дітей був мультилобулярний і формувався на тлі активності запального процесу в печінці у 22,0% дітей. Переважна більшість цих дітей (70,0%) входила до І групи (рис.6.8).

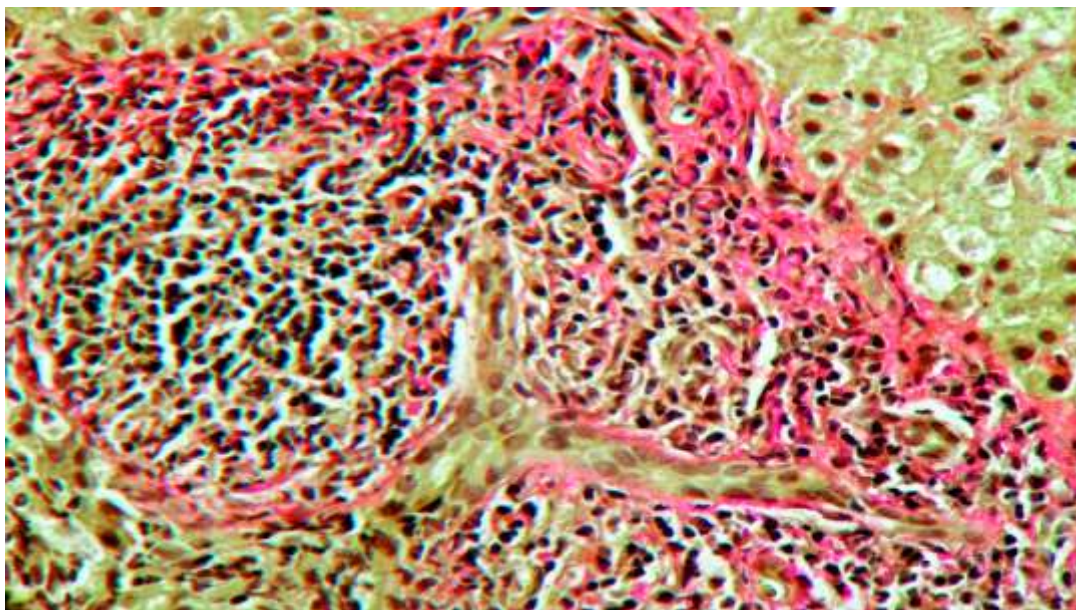


Рис.6.4. Біоптат печінки. Дитини 10 років, на момент проведення пункційної біопсії печінки до лікування Виразна розповсюджена лімфо – плазмоцитарна інфільтрація порто-портальних траків та септ. Забарвлення пікрофуксином за Ван Гізоном. Мікрофотографія. Збільшення: 10 × 40.

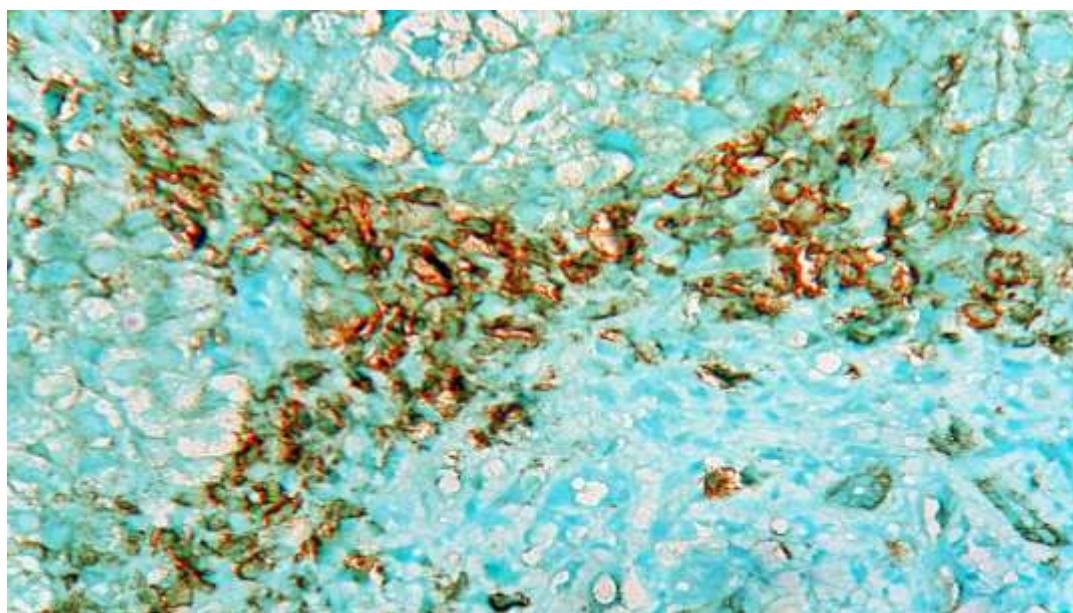


Рис. 6.5. Багаточисельні CD 138 імунопозитивні плазмоциди в біоптаті печінки дитині 13 років до лікування автоімунного гепатиту. Моа-HuCD-138, Ab-2 Clone MI15(Thermo Fisher Scientific, USA). Збільшення: 10 × 40.

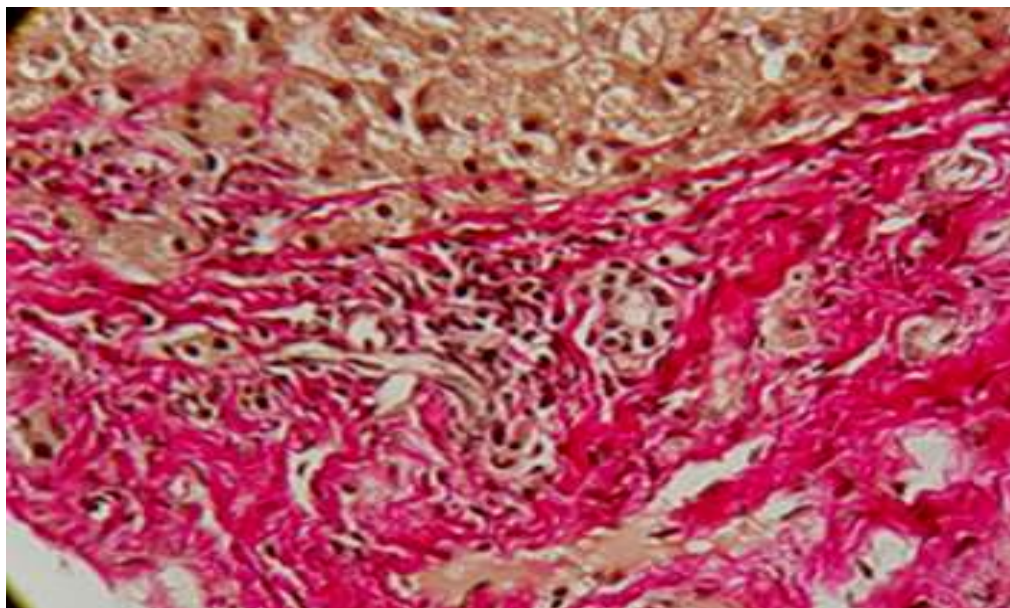


Рис 6.6. Лімфо-плазмоцитарна інфільтрація портального тракту і перипортальної зони у дитина 3 років, яка отримувала лікування глюкокортикоїдами протягом 6 місяців. ІГА мінімальна (3 бали). Індекс фіброзу F4 за METAVIR. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Збільшення: 10 × 40.

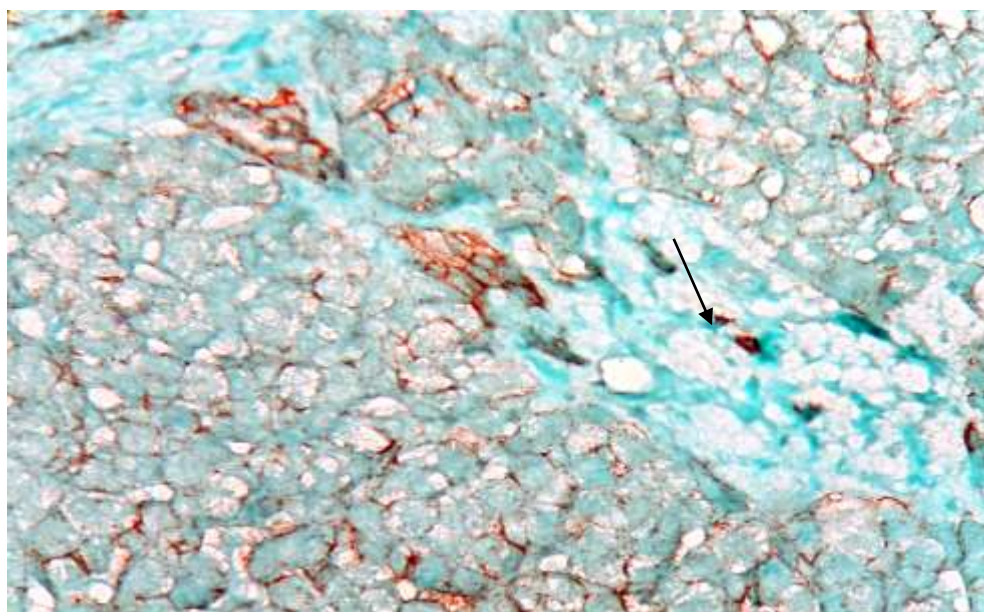


Рис. 6.7. Поодинокі CD 138 імунозапальні плазмоциди в біоптаті печінки дитини 3 років після лікування глюкокортикоїдами автоімунного гепатиту протягом 6 місяців. Мо a-Hu CD-138, Ab-2 Clone MI15(Thermo Fisher Scientific, USA). Збільшення: 10 × 40.

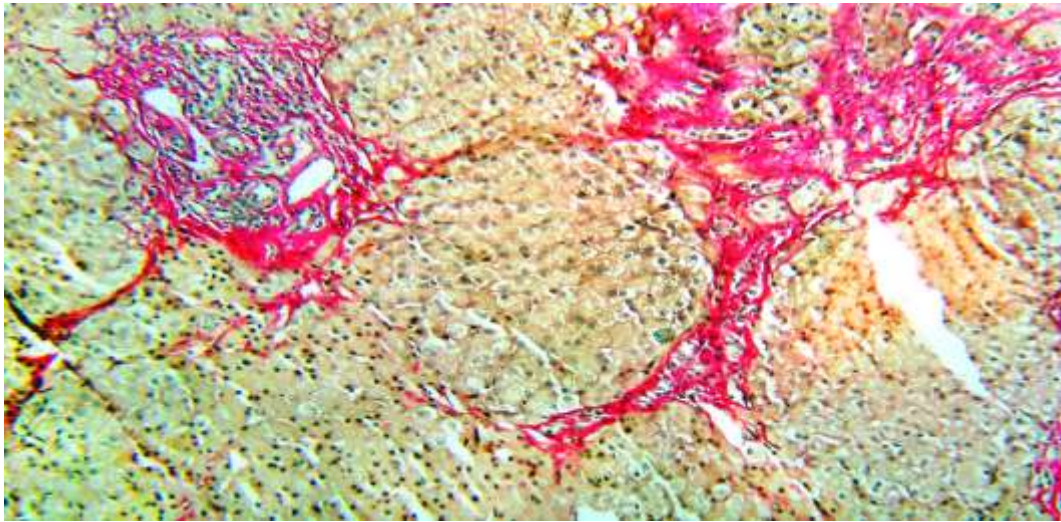


Рис. 6.8. Помірна лімфо-плазмоцитарна інфільтрація портальних трактів у дитини 3 років із автоімунним гепатитом та мультилобулярним цирозом печінки у дитини 3 років, яка отримувала лікування глюкокортикоїдами протягом 6 місяців. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Збільшення: 10×40 .

В обох групах дітей ми провели аналіз частоти біохімічних синдромів. Узагальнені дані наведені в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2

Показники біохімічних синдромів в досліджуваних групах дітей, (n=45), Me [UQ-LQ].

Біохімічні синдроми	Значення показника	
	I групи (n=25)	II група (n=20)
1	2	3
Синдром цитолізу:		
- АЛТ, Од/л	732 [236-1006]	263 [114-670]*
- АСТ, Од/л	430 [223-771]	163,5 [89-451,5]*
Мезенхімально-запальний:		
- загальний білок, г/л	81,4[72,9-85,6]	75,9 [71,7-83,9]
- γ -глобулінів, %	26,6 [20-36]	20 [17,6-23,8]*
- тимолова проба, Од	9,5 [5,3-12,5]	6,3 [3,9-11,35]*
- IgG, г/л	14,5 [12,3-18,9]	11,28 [9,5-14,2]*

Продовження таблиці 6.2

1	2	3
Синдром холестазу:		
- гіпербілірубінемія, мкмоль/л	28 [16-50]	21,2 [11,3-51]
- ЛФ, О/л	285 [220-427]	221,5 [167-352]
- ГГТ, Од/л	76 [55-219]	88 [52,5-162]*
Примітка.*- відмінність вірогідна ($p < 0,05$) між I та II групами.		

За результатами статистичного аналізу ми виявили достовірну різницю між порівнюваними групами за критерієм Вілкоксона за показниками цитолітичного (АЛТ, АСТ, ГГТ), та мезенхімально запального синдрому (тимолова проба, γ -глобулін та IgG) ($p < 0,05$).

Аналіз гістологічної активності гепатиту в обстежених групах показав, що в групі дітей які отримували лікування на момент проведення пункційної біопсії печінки була нижча гістологічна активність в балах (ІГА) в порівнянні із хворими, які не отримували кортикостероїдів (КС). Аналіз взаємозв'язку гістологічної активності гепатиту із біохімічними показниками цитолізу (АЛТ, АСТ), мезенхімально-запального синдрому (тимолова проба, загальний білок, IgG, γ -глобуліни) та холестатичного (загальний білірубін, ГГТ, лужна фосфатаза) синдромів проведено за допомогою рангового кореляційного аналізу Спірмена. Результати представлено в таблиці 6.3, 6.4.

Таблиця 6.3

Кореляційні (τ) зв'язки між ІГА та показниками біохімічних синдромів у дітей з автоімунним гепатитом у дітей I (n=25) та II (n=20) груп

Біохімічні синдроми	Значення показника			
	I групи (n=25)		II група (n=20)	
	R	p	R	p
1	2	3	4	5

Продовження таблиці 6.3

1	2	3	4	5
Синдром цитолізу:				
- АЛТ, Од/л	0,12	0,53	- 0,39	0,032*
- АСТ, Од/л	0,06	0,77	- 0,36	0,049*
Мезенхімально-запальний:				
- загальний білок, г/л	0,095	0,65	1,09	0,28
- γ -глобулінів, %	0,53	0,006*	- 0,26	0,80
- тимолова проба, Од	0,52	0,001*	- 0,50	0,005*
- IgG, г/л	0,51	0,001*	1,46	0,15
Синдром холестазу:				
- гіпербілірубінемія, мкмоль/л	0,22	0,27	- 0,31	0,15
- ЛФ, О/л	- 0,23	0,26	- 0,24	0,81
- ГГТ, Од/л	0,05	0,79	0,4	0,002*
Примітка.*- відмінність вірогідна ($p < 0,05$)				

За результатами кореляційного аналізу у I групі дітей з АГ встановлено позитивний помірний прямий кореляційний взаємозв'язок між гістологічною активністю захворювання у балах та активністю мезенхімально-запального синдрому: тимолова проба $-p=0,001$, γ -глобуліни $p = 0,006$ та IgG- $p = 0,001$, що свідчить про активацію клітин ретикулоендотеліальної системи печінки імунним запаленням.

У дітей II групи дітей які отримували ГКС на момент проведення пункційної біопсії печінки встановлено помірний негативний кореляційний зв'язок між гістологічною активністю в балах та активністю цитолітичного синдрому: АЛТ – $p = 0,032$, АСТ – $p = 0,049$, та тимолової проби $p = 0,005$, та помірний позитивний прямий зв'язок між гістологічною активністю та ГГТ – $p = 0,02$.

6.2. Особливості фіброзу печінки у дітей з автоімунним гепатитом в динаміці лікування за даними еластографії зсувної хвилі в співставленні з результатами морфологічного дослідження

Еластографія паренхіми печінки методом зсувної хвилі, для визначення стадії фіброзу проведена у 45 хворих, яким було проведено морфологічне дослідження біоптату печінки, їх характеристика наведена в таблиці 6.4.

Таблиця 6.4.

Розподіл дітей з АГ за стадією фіброзу та ступенем гістологічної активності визначеної методом еластографії та морфологічно (n = 45), абс.ч., (%)

Показник	Абс.ч.,%
Еластографія, кПа:	
1)F 1	3 (6,0)
2)F 2	8 (18,0)
3)F 3	16 (36,0)
4)F 4	18 (40,0)
Стадія фіброзу METAVIR:	
F 1,	3 (7,0)
F 2,	12(27,0)
F 3,	20 (44,0)
F 4.	10 (22,0)
Індекс гістологічної активності за Knodell:	
1-3 бали (мінімальна)	12 (27,0)
4-8 бали (низька)	5 (11,0)
9-12 бали (помірна)	11 (24,0)
13-18 бали (висока)	17 (38,0)

Для визначення показника жорсткості печінки (в кПа) який може характеризувати виразний фіброз (стадія фіброзу > F2 за METAVIR) у обстежених дітей проведено ROC аналіз з визначенням AUROC та «точки

відсічення» для показників еластографії. Інтегральною характеристикою для оцінки ефективності тесту є площа під ROC – кривою - AUROC (area under ROC). В дослідження були включені показники еластографії в кПа усіх обстежених дітей (n = 45).

У 93,0% (n=42) дітей діагностовано стадію фіброзу \geq F2 METAVIR за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки (таблиця 6.5). У зв'язку з цим, провести ROC аналіз для визначення показника еластографії для стадії фіброзу F1 та F2 у нашому дослідженні було неможливим.

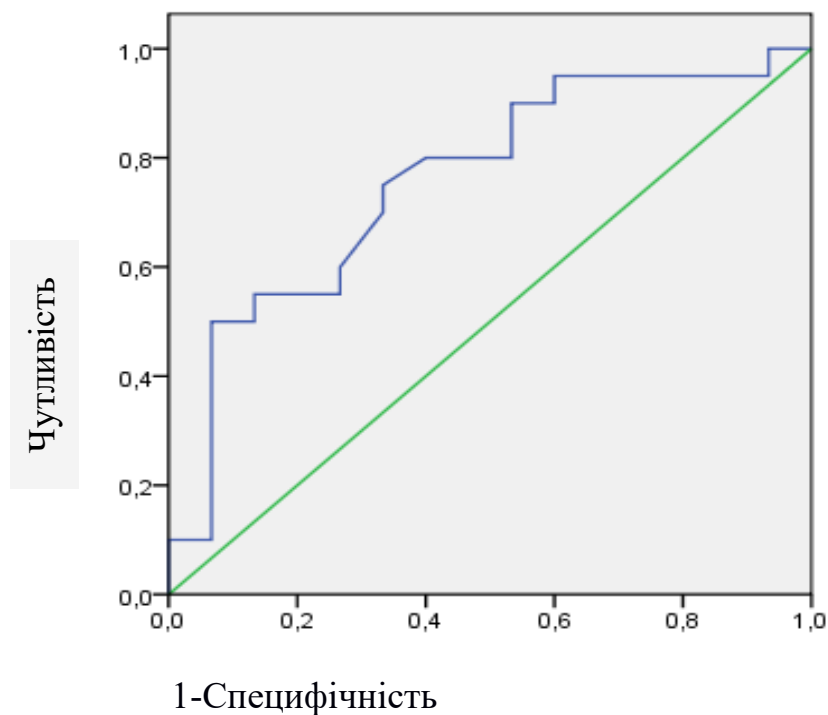


Рис. 6.9. ROC крива значення показника еластографії печінки для діагностики стадії фіброзу F3 METAVIR.

AUROC для показника еластографії, який відповідає фіброзу F3 складав 0,59 (ДІ 0,59 – 0,93). «Точкою відсічення» для діагностики фіброзу F3 METAVIR було значення показника еластографії 9,65 кПа (чутливість – 75,0%, специфічність – 77,0%).

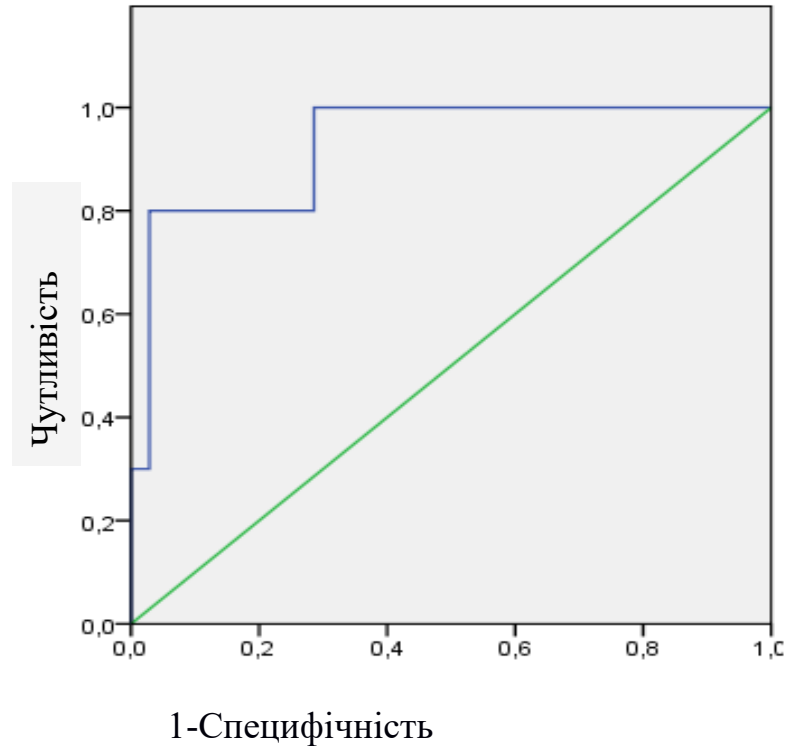


Рис. 6.10. ROC крива для значення показника еластографії печінки для діагностики стадії фіброзу F4 METAVIR.

ROC аналіз проведений у 10 дітей із стадією фіброзу F4 METAVIR за даними гістологічного дослідження біоптату печінки показав, що AUROC для показника еластографії, який відповідає стадії фіброзу F4 складає 0,92 (ДІ 0,81– 1,0). «Точкою відсічення» для діагностики стадії фіброзу F4 за METAVIR було значення показника еластографії 13,4 кПа (чутливість – 80,0 %, специфічність – 96,0 %).

Для визначення впливу імуносупресивного лікування на показники жорсткості паренхіми печінки ми провели аналіз у I та II групах. У дітей I групи медіана показника жорсткості паренхіми печінки становила 13,1[9,7-18,4]кПа, у дітей II групи 9,8[7,3-12,6]кПа. Аналіз взаємозв'язку гістологічної активності гепатиту із показниками жорсткості паренхіми печінки в I та II групах дітей показав що, в групі дітей які отримували лікування на момент проведення пункційної біопсії печінки була нижча гістологічна активність в балах (ІГА) порівняно з хворими, які не отримували кортикостероїдів (КС) (рисунок 6.3,6.4,6.5,6.6,6.7,6.8). З цією метою ми провели дослідження

зв'язку гістологічної активності АГ із показниками жорсткості паренхіми печінки (кПа) за допомогою рангового кореляційного аналізу Тау Кендалла, результати представлено в таблиці 6.5.

Таблиця 6.5.

Кореляційні (τ) зв'язки між показниками гістологічної активності (ІГА) та показниками жорсткості паренхіми печінки у дітей з аутоімунним гепатитом до та на фоні лікування(n=45)

Показник	Показники жорсткості паренхіми печінки у дітей з АГ до лікування, кПа І група (n=25)	Показники жорсткості паренхіми печінки у дітей з АГ на фоні лікування, кПа ІІ група (n=20)
	τ	τ
Активність в балах	0,30*	0,07
Примітка. *- відмінність вірогідна ($p < 0,05$).		

За результатами кореляційного аналізу у І групі дітей з АГ встановлено позитивний значимий взаємозв'язок між гістологічною активністю захворювання у балах та жорсткістю паренхіми печінки – $\tau = 0,30$ ($p = 0,003$).

В ІІ групі дітей за результатами кореляційного аналізу мав місце слабкий недостовірний зв'язок між гістологічною активністю захворювання та жорсткістю паренхіми печінки - $\tau = 0,07$, $p > 0,05$ ($p = 0,6$).

Частота біохімічних синдромів найбільш повно представлена в І групі дітей, які на момент проведення дослідження не отримували лікування. У дітей І групи печінці (n=25) за результатами біохімічного дослідження крові: підвищення рівня трансаміназ до 3 норм мало 8,0% (n=2), низька біохімічна активність спостерігалось в 16,0% (n=4), помірна у 12,0%(n=3), а у 64,0%(n=16) дітей мало місце підвищення рівня трансаміназ більше 10 норм. У дітей ІІ групи (n=20) нормальний рівень трансаміназ на момент проведення пункційної біопсії печінки був у однієї дитини (5,0%), мінімальне

підвищення трансаміназ встановлено у 20,0% (n=4) випадків, низька активність - у 25,0% (n=5), помірна - у 5,0 % (n=1), у 45,0 % (n=9) спостерігалось підвищення трансаміназ > 10 норм.

Для оцінки впливу імуносупресивного лікування на показники жорсткості печінки ми провели аналіз впливу біохімічної активності автоімунного гепатиту на показники жорсткості паренхіми печінки через 6 та 12 місяців лікування. Узагальнені дані наведені в таблиці 6.6.

Таблиця 6.6

Окремі лабораторні показники активності гепатиту та жорсткості паренхіми печінки через 6 та 12 місяців лікування (n=35), Me [UQ-LQ]

	АЛТ, ОД/л	IgG, г/л	Загальний білірубін, мкмоль/л	γ-глобуліни, %	Жорсткість паренхіми печінки, кПа
До лікування	725[219-1353] ^{*,**}	12,6[10,3-20] ^{*,**}	28[14,6-49] ^{*,**}	28,6[18,5-38] ^{*,**}	13,7 [9,2-17,7] ^{***}
Через 6 місяців	27[21-48]	10[7,9-12,6]	17[14,2-21,2]	15,4[13,0-18,2]	9,2 [6,6-12,1]
Через 12 місяців	30[20-75]	10,8[10,0-16,8]	18,7[17,2-21,5]	18,7[17,2-21,5]	8,1 [5,9-11,15]
Примітка- * відмінність вірогідна (p < 0,05) до та через 6 місяців лікування. **- відмінність вірогідна (p < 0,05) до та через 12 місяців лікування.					

Через 6 та 12 місяців лікування, практично в усіх дітей вдалось досягнути нормалізації біохімічних показників та зниження показників жорсткості паренхіми печінки (p<0,05).

Різниця показників жорсткості печінки до лікування та через 6 місяців лікування складала 29,0±13,58%, що відображає вклад частки активності захворювання в показник жорсткості печінки. Даний статистичний аналіз підтверджений відповідно до критерія Вілкоксона (p < 0,05).

З метою удосконалення методу оцінки стадії фіброзу печінки у пацієнтів з АГ запропоновано спосіб визначення стадії фіброзу печінки

неінвазивним методом до лікування, без урахування активності запального процесу в печінці, з використанням формули $F=F_1 - (F_1 \cdot 30)/100$, де F_1 - показник еластографії печінки до лікування в кПа, 30 % - різниця показників жорсткості до лікування та на фоні лікування, F - показник еластографії печінки в кПа без урахування активності. Проведений математичний аналіз діагностичної ефективності даного методу підтвердив їх високу діагностичну ефективність у встановленні стадії фіброзу у дітей з АГ (Se 75,0% Sp 17,0% PV «+» 78,26%; PV «-» 14,29%; точність 63,3%).

Оптимальним терміном виконання еластографії печінки методом зсувної хвилі для визначення стадії фіброзу у дітей з АГ є проведення дослідження через 6 місяців від початку імуносупресивної терапії, за умови досягнення клініко-лабораторної ремісії, із наступним моніторингом кожні 6 місяців для оцінки перебігу хвороби.

Узагальнюючи результати розділу можна зробити таке резюме:

1. Автоімунний гепатит у переважної більшості (67,0%) дітей характеризується виразним фіброзом > F2 METAVIR з високою активністю гепатиту (у 62,0% дітей ІГА був > 9 балів за Knodell, із них у 60,0% мав місце високоактивний запальний процес в печінці ІГА > 12 балів Knodell).

2. У 22,0 % вперше обстежених дітей виявлено ознаки мультилобулярного цирозу печінки.

3. На фоні лікування відбувається патоморфоз АГ - зниження гістологічної активності із мінімальним виявленням позитивної експресії маркера плазмоцитів CD138, зменшення кількості ацидофільних тілець Каунсильмена, зниження здатності лімфоцитів до скупчення та утворення лімфоїдних фолікулів, відсутність розеткоутворення.

4. Пункційну біопсію печінки слід проводити до початку імуносупресивного лікування, що дозволить покращити ефективність діагностики та лікування АГ у дітей.

5. У 66,0% дітей стадія фіброзу отримана при гістологічному дослідженні співпадала з даними еластографії печінки.

6. Застосування ультразвукової еластографія зсувної хвилі для оцінки стадії фіброзу у дітей з АГ в період розгорнутих клінічних проявів не є доцільним, оскільки активність гепатиту впливає на показники жорсткості паренхіми печінки.

7. У дітей з АГ еластографію печінки варто проводити щонайменше через 6 місяців імуносупресивного лікування, із наступним моніторингом кожні 6 місяців, для визначення ризику прогресування гепатиту.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Березенко В.С., Михайлюк Х.З. Морфологічні особливості автоімунного гепатиту у дітей. Науково-практична конференція молодих вчених присвячена 25-річчю Національної академії медичних наук України, 23 березня. *Журнал Національної академії медичних наук України, Спеціальний випуск*. 2018. С.163. (Дисертантом зібрано, систематизовано та проаналізовано матеріал, підготовлені тези до друку).

2. Задорожна Т.Д., Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Келихевич С.М. Лікувальний патоморфоз автоімунного гепатиту у дітей. *Art of Medicine*. 2018. №3(7).С.54-59.(Здобувач самостійно забезпечила відбір, обстеження та спостереження за хворих; обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів).

3. Березенко В. С., Задорожна Т. Д., Михайлюк Х. З., Тарасюк Б. А., Коробко В. Ф., Келихевич С. М. Морфологічні та ультразвукові особливості фіброзу печінки в дітей з автоімунним гепатитом. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 44). С. 330–336. DOI: 10.14739/2310-1237.2018.3.1518155. (Особистий внесок - здобувач здійснила пошук та обробку літературних даних, самостійно провела відбір хворих; обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовку матеріалів до друку).

4. Березенко В.С. Можливості поєднання неінвазивних методів для оцінки стадії фіброзу печінки у дітей із хронічним гепатитом С. Березенко В.С., Диба М.Б., Михайлюк Х.З., Ткалик О.М., Крат В.В., Тарасюк Б.А. Коробко В.Ф. *Сучасна педіатрія*. 6(94)/2018- С. 14-22 (Дисертант провела збір матеріалу, обробку отриманих даних, аналіз та узагальнення отриманих результатів підготувала статтю до друку).

5. Дикан І.М., Тарасюк Б.А., Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Коробко В.Ф. Винахідники; Державна установа «Інститут ядерної медицини та променевої діагностики НАМН України», Державна установа «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України» патентовласники. Спосіб діагностики автоімунних захворювань печінки у дітей. Патент на корисну модель №130181; № u201806393; Заявка 07.06.2018; опубл. 26.11.2018. Бюл. № 22.(Особистий внесок- підбір хворих та аналіз отриманих результатів).

6. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Задорожна Т.Д., Тарасюк Б.А., Коробко В.Ф. Винахідники. Державна установа «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України» патентовласник. Спосіб оцінки фіброзу печінки у дітей з автоімунним гепатитом Патент на корисну модель 131392; № u201808143; Заявка 23.07.2018; опубл. 10.01.2019. Бюл. № 1. (Особистий внесок - здобувачу належить ідея корисної моделі, ним було проведено статистичну обробку матеріалу, аналіз отриманих результатів, оформила заявку на корисну модель).

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проблема своєчасної діагностики та лікування АГ як серед дорослого так і дитячого населення є надзвичайно актуальною в усьому світі. Неухильний ріст захворюваності, швидкі темпи прогресування і розвиток тяжких ускладнень, що призводять до ранньої інвалідизації з високим відсотком летальності в дитячому віці, спрямовують науковців на поглиблене вивчення механізмів формування та прогресування захворювання, а також пошуку методів ранньої діагностики та профілактики.

Актуальність проблеми АГ визначається його часто безсимптомним початком та перебігом, у зв'язку з чим більш ніж у 50,0% дітей захворювання діагностується на незворотній стадії – цироз печінки. Третина пацієнтів дитячого віку, з встановленим діагнозом автоімунного гепатиту, потребують трансплантації печінки [16].

В основі прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту, як і будь якого хронічного захворювання печінки, є швидкість розвитку фіброзу печінки, кінцевою стадією якого є цироз. Вивченню патогенетичних механізмів фіброзу печінки присвячена велика кількість досліджень [27,28,34]. Однак, наукових робіт, щодо особливостей фіброгенезу та механізмів його формування в дитячому віці небагато. В 2007 році Лук'янова О.М. та Березенко В.С. показали, що при АГ, на відміну від вірусного ураження печінки, темпи фіброгенезу є більш значними і характеризуються підвищеним синтезом та пригніченою деструкцією колагену. Морфологічним еквівалентом цього дисбалансу є виразний фіброз з високою експресією колагену I типу, а основним механізмом активації фіброгенезу є імуноопосередкований запальний процес в печінці [2].

Напрямки наукових досліджень сьогодні, спрямовані на пошук факторів, що впливають на перебіг та ефективність лікування хронічних дифузних захворювань печінки. Все більше уваги приділяється дослідженню

порушень обміну вітаміну D у хворих на ХГ, як фактору, який може прискорювати прогресування патологічного процесу в печінці та негативно впливати на ефективність терапії, оскільки печінка відіграє важливу роль в метаболізмі та плейотропних функціях вітаміну D [209]. Біологічні ефекти вітаміну D опосередковані зв'язуванням з рецепторами вітаміну D (*VDR*), які належить до суперсімейства ядерних рецепторів стероїдних гормонів. Велика кількість поліморфних генетичних варіантів рецепторів вітаміну D може пояснювати варіабельність і різноманітність його біологічних впливів. З'являється все більше доказів, що вітамін D бере участь у зменшенні запалення та процесах фіброзування в печінці [88,97,112]. За даними ряду досліджень, сприятливий вплив вітаміну D при захворюваннях печінки, зумовлений його можливістю активувати і регулювати вроджений та адаптивний імунітет [90,166], стимулюючи механізми, пов'язані з ліквідацією патогенів через секрецію кателіцидина і бета-дефензинів, хемотаксис і фагоцитоз макрофагів [90,166]. Зв'язуючись з *VDR*, активні форми вітаміну D здійснюють свої ефекти переважно через геномні механізми впливу. За даними досліджень експресія *VDR* в гепатоцитах, купферовських і зірчастих клітинах корелює з пригніченням та подавленням фіброгенезу [62,110], а розвиток фіброзу печінки пов'язаний з генетичними варіантами *VDR* та низькими показниками 25(OH)D в сироватці крові [111].

Визначення темпів прогресування захворювання з діагностикою стадії фіброзу є надзвичайно важливим для практикуючого лікаря, оскільки дозволить прогнозувати ефективність терапії та розробити стратегію ведення хворого. Пункційна біопсія печінки із морфологічним та імуногістохімічним дослідженням біоптату залишається основним методом для оцінки стадії фіброзу та активності запального процесу в печінці. Однак, враховуючи інвазивність методики, сучасні наукові дослідження спрямовані на пошук неінвазивних та інформативних методів візуалізації та оцінки стадії фіброзу. Дані дослідження базуються на визначенні жорсткості паренхіми печінки (транз'єнтна еластографія, ARFI (акустичного радіаційного тиску), магнітно-

резонансна еластографія, 2D-еластографія, еластографія зсувної хвилі паренхіми печінки). Еластографія зсувної хвилі паренхіми печінки є найбільш широко використовувана і перевірена методика, яка є зручною у використанні. Враховуючи той факт, що перебіг автоімунного гепатиту характеризується високоактивним запальним процесом в печінці, багато неінвазивних тестів для оцінки стадії фіброзу, в період розгорнутої клінічної картини АГ мають свої обмеження. Так, відповідно до рекомендацій EFSUMB 2017 перед проведенням еластографії необхідно виключити у хворого наявність наступних станів (підвищення АСТ і/або АЛТ в п'ять раз вище норми, обструктивний холестаза, печінкову недостатність, гострий гепатит і інфільтративні захворювання печінки) і/або враховувати їх при інтерпретації результатів. Наявність цих станів значно підвищує значення показників які характеризують фіброз печінки і є причиною хибних результатів [123-133]. У зв'язку з цим, результати еластографії у хворих з АГ, часто не дозволяють отримати достовірну інформацію, щодо виразності фіброзу печінки. Ми врахували вищевказані рекомендації при проведенні наукового дослідження, отримані результати та впровадження їх в роботу закладів охорони здоров'я, дозволять уникнути неправильної оцінки стадії фіброзу печінки та розробити практичні рекомендації, щодо термінів проведення еластографії у пацієнтів з АГ.

Наведені вище дані, стали аргументом для проведення дисертаційної роботи, в якій на основі комплексного аналізу клініко-параклінічного перебігу АГ були визначені предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей, залежно від активності гепатиту та стадії фіброзу, морфологічних особливостей, забезпеченості вітаміном D та особливостей поліморфізму гену VDR (ApaI, BsmI, TagI), оптимальні терміни використання еластографії зсувної хвилі для оцінки стадії фіброзу печінки у даного контингенту хворих .

Для виконання поставленої мети в центрі дитячої гепатології було обстежено 60 дітей хворих на АГ. Всі хворі були розділені на групи залежно

від біохімічної та гістологічної активності запального процесу в печінці, а також за стадією фіброзу визначену гістологічно та методом еластографії зсувної хвилі паренхіми печінки. Діагноз встановлено відповідно до рекомендацій Європейської асоціації з вивчення захворювань печінки (European Association for the Study of Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis, 2015) [26]. Усім дітям визначалась сироваткова концентрація 25(OH)D. У 51 дитини проведено дослідження поліморфізму *ApaI*, *TagI*, *BsmI* гена рецептора *VDR*. У 45 дітей проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження біоптату печінки.

Отримані результати показали, що АГ хворіють переважно дівчатка пре- та пубертатного віку, 68,0% (n=41) проти 32,0% хлопців (n=19) ($p < 0,005$), що продемонстровано у багатьох дослідженнях [26,40,41]. Медіана віку для дівчаток на момент обстеження складала 11 [8 - 15] років, хлопців – 12 [8 - 15] років ($p > 0,05$). У більшості 62,0 % (n=37) обстежених АГ вперше діагностовано у віці 11 – 18 років, у 30,0 % (n=18) в 6 - 10 річному віці, у 8,0 % (n=5) діагноз було встановлено до 5 років. У 63,0 % (n= 38) пацієнтів захворювання маніфестувало в весняно-літній період ($p = 0,0035$), що підтверджує роль надмірної інсоляції, як тригерного фактору запуску автоімунних реакцій [204]. Аналіз даних анамнезу показав, що у 48,0% (n=29) хворих діагностичний пошук з моменту появи перших скарг до встановлення діагнозу складав 1-1,5 років. У 52,0% (n=31) пацієнтів, тривалість хвороби не вдалося встановити у зв'язку з стертою клінічною симптоматикою. Літературні джерела також свідчать про часто безсимптомний початок та тривалий перебіг захворювання, що призводить до пізньої діагностики вже на прогресуючій стадії захворювання при первинному зверненні [29]. Про труднощі в постановці діагнозу свідчить той факт, що лише у 42,0 % (n=25) дітей діагноз був запідозрений або встановлений за місцем проживання, а у 58,0 % (n=35) хворих діагноз встановлено під час обстеження в клініці інституту. У 32,0 % (n=19) дітей діагностовано цироз печінки, із них у 84,0%

(n=16) клас А за Чайлд-П'ю, в 11,0% (n=2) – клас В, а клас С був діагностований лише у 1 дитини (5,0%).

Аналіз детально зібраного сімейного анамнезу дозволив нам виокремити один з основних факторів прогресуючого перебігу АГ. В третини обстежених дітей родичі першого порядку мали різного роду автоімунні захворювання, серед яких у 44,0% мав місце автоімунний тиреоїдит, у 33,0% - ревматоїдний артрит, у 6,0 % - бронхіальна астма та у 17,0 % - цукровий діабет першого типу, що достовірно збільшувало ризик у них прогресуючого перебігу АГ в 3,4 рази (OR 3,4; 95% CI 0,85-13,5; 95% RR=1,4; 95% CI 1,01-1,93; Se 57%; Sp 85%).

Аналіз структури та частоти захворюваності дітей з АГ показав, що пацієнти мали невисоку частоту інфекційної патології в анамнезі, що, можливо, пов'язано з високою толерантністю імунної системи до подразників, зрив якої при несприятливих обставинах закінчується генетично обумовленим гіперергічним автоімунним процесом. Гострий початок АГ мав місце у 60,0% (n=36) дітей, клінічна картина була подібна до гострого вірусного гепатиту. Розмаїття клінічних проявів маніфестації хвороби була неспецифічною та визначалась ступенем порушення функціонального стану печінки і була максимально представлена у хворих з високою та помірно активним перебігом АГ. Основними клінічними симптомами у обстежених дітей були інтоксикаційний, астено-вегетативний, диспепсичний синдроми, гепатоспленомегалія та позапечінкові прояви (автоімунний тиреоїдит, автоімунна гемолітична анемія, неспецифічний коліт, вітиліго, псоріаз та артралгії транзиторного характеру). У 52,0% дівчаток пубертатного віку спостерігались порушення оваріально-менструального циклу, а саме: дисменорея – у 62,0 % та аменорея – у 38,0 %. Помірний больовий абдомінальний синдром мав місце у 42,0% дітей та, з найбільшою ймовірністю, пов'язаний із супутньою патологією гастроудоденальної зони та біліарної системи. Наявність та виразність “малих” печінкових знаків (телеангіоектазії, пальмарна еритема), гепатоспленомегалії та

жовтяниці у хворих визначалася активністю гепатиту і були максимально представлені у дітей з високою та помірно активним АГ. У 50,0% хворих, як прояв зниженої синтетичної функції печінки, мав місце геморагічний синдром у вигляді носових кровотеч. Варто зазначити, що у більшості (75,0%) хворих періодичні носові кровотечі були ще до маніфестації розгорнутої клінічної картини АГ.

За результатами біохімічного дослідження, проведеного відповідно до протоколу [26], встановлено, що провідними біохімічними синдромами у госпіталізованих хворих з АГ були: цитолітичний (гіпертрансаміназемія), мезенхімально-запальний (гіперпротеїнемія, гіпергаммаглобулінемія, зростання тимолової проби, пришвидшення ШОЕ, підвищення рівня IgG), холестатичний синдроми (гіпербілірубінемія переважно за рахунок прямої фракції, підвищення ГГТ). Синдром цитолізу (підвищення рівня трансаміназ в межах 3-20 норм), мав місце у 95,0 % обстежених, що характерно для цих хворих і свідчить про підвищення продукції прозапальних цитокінів в період розгорнутої клінічної картини АГ [17,162,178]. У трьох дітей (5,0%), які перебували в періоді неповної клініко-лабораторної ремісії, спостерігались нормальні показники трансаміназ сироватки крові. Відомо, що ключову роль у розвитку запального процесу при АГ відіграє порушення механізмів регуляції імунної відповіді, опосередковане активацією та стимуляцією цитотоксичних Т-лімфоцитів та макрофагів ІФН- γ , продукцією аутоантитіл В-лімфоцитами або плазматичними клітинами [160-162]. В досліджуваній групі дітей з АГ імунноопосередковане запалення характеризувалось мезенхімально-запальним синдромом: так підвищення рівня γ -глобулінів мало місце у 83,0% хворих, тимолової проби – у 78,0% дітей, IgG- 57,0%) обстежених, а ЦІК - 93,0% пацієнтів, що співпадає з даними літератури [26,29]. Варто зазначити, що підвищення тимолової проби достовірно частіше реєструвалось в групі дітей з високою та помірною активністю ($\chi^2 = 5,28$; $p < 0,005$ між підгрупами з високою, помірною та низькою і мінімальною активністю АГ). Гіперпротеїнемія виявлена лише у 50,0 % дітей з АГ.

Підвищення ШОЕ, як прояв диспротеїнемії, мало місце в 35,0% обстежених, з них у 45,0% дітей з помірною та високою активністю, та лише у 18,0% при низькій та мінімальній активності ($\chi^2 = 3,84$; $p < 0,005$ між підгрупами з високою та помірною та низькою і мінімальною активністю АГ).

Синдром холестазу у хворих з АГ був представлений гіпербілірубінемією та підвищенням ГГТ. Підвищення рівня білірубіну переважно за рахунок прямої фракції достовірно частіше реєструвалось у дітей з високою та помірно активним гепатитом ($\chi^2 = 12,5$; $p < 0,005$ між групою з високою та помірною активністю та неактивним гепатитом). Підвищені показники ГГТ виявлено у 92,0 % дітей ($n=54$), з них у 95,0% дітей з помірною і високою активністю та 94,0% дітей з мінімальною та низькою активністю гепатиту.

За результатами аналізу спектру автоантитіл, у обстежених хворих переважав І тип АГ (80,0 %), в той час як діагностично значимий вміст anti-LKM-1, що характеризує АГ II типу встановлено лише у 3,0% обстежених. Отримані нами дані частково співпадають з даними літератури і найбільшою мірою стосуються АГ I типу, та мають розходження з частотою АГ II типу, який за даними літератури має місце у 14-28% дітей, залежно від регіону проживання [26,29,40,55]. Єдине дослідження проведене в Україні, щодо перебігу АГ у дітей, виявило схожу тенденцію в частоті типів АГ, однак кількість дітей з II типом АГ була вищою ніж в нашому дослідженні [2]. Серонегативний варіант АГ мав місце у 12,0% обстежених нами дітей, за даними літератури при вказаному варіанті АГ в 19-22% можливим є початок захворювання із гострої печінкової недостатності, чого не спостерігалось у наших хворих [29].

У 32,0% дітей з цирозом печінки, внаслідок АГ виявлено: порушення білково-синтетичної функції печінки, що проявлялось зниженням концентрації альбуміну в сироватці крові в 21,0%, зниженням ПТІ в 26,0%, а також наявністю гіпокоагуляційного синдрому, що характеризувався подовженням МНО та зростанням АЧТЧ у 84,0% випадків. У даної когорти

дітей, як прояв гіперспленізму, в загальному аналізі крові мали місце: анемія в 53,0% випадків, лейкопенія в 52,0% та тромбоцитопенія у 68,0% хворих.

Усім дітям виконано рутинне ультразвукове дослідження в В-режимі датчиками 3,5-5,0 МГц та високочастотними датчиками від 7,5 до 10 МГц. УЗД органів черевної порожнини із доплерографією судинної системи печінки мала різну сонографічну картину, залежно від активності та ступеня прогресування захворювання. Для АГ характерними були значні ехоструктурні зміни в печінці, паренхіма якої мала вигляд “зораного поля”, за рахунок неоднорідності і підвищення ехогенності печінки, наявність дрібних тубулярних структур, збільшення хвостатої частки печінки, а також ущільнення та нерівномірне потовщення глісонової капсули до 0,8 – 1 мм. У дітей з прогресуючим перебігом захворювання та цирозом печінки мали місце: дифузна неоднорідність ехогенності паренхіми печінки з точковими гіперехогенними структурами, дрібно вогнищевий характер дифузних змін, звивистість контурів печінки при ВЧ-скануванні, надлишок сполучної тканини в міждольовій борозні, ущільненість і нерівність глісонової капсули, ущільнення стінок судин печінки, розширення портальної вени, фіброзні зміни по ходу судин системи портальної вени. Ехографічні прояви портальної гіпертензії у вигляді розширення портальної вени мало місце у 89,0%, селезінкової - у 52,0%, звивистість селезінкової вени діагностовано у 26,0% дітей, варикозне розширення вен стінок жовчного міхура в 16,0% дітей з ЦП. Збільшення селезінки за даними УЗД мало місце у 62,0 % хворих. Варто зазначити, що при фізикальному обстеженні лише у 48,0% дітей селезінка виступала з під краю лівої реберної дуги, а при УЗД зафіксовано збільшення поперечних розмірів цього органу. Асцит мав місце у 26,0% дітей з ЦП. Ехографічні ознаки цирозу печінки були у 28,0% (n=17) дітей, а його клініко-лабораторні прояви у 27,0 % (n=16) хворих, а гістологічні – у 22,0% (n=10) випадків з 45 дітей, яким проведено морфологічне дослідження печінки,, що частково співпадає з результатами дисертаційної роботи Березенко В.С.2007р, «Клініко-патогенетичні особливості фіброгенезу

печінки при хронічних гепатитах у дітей та шляхи його медикаментозної корекції» [2]. Нажаль рутинне ультразвукове дослідження у хворих з АГ не дозволяє оцінити виразність фіброзних змін в печінці та діагностувати ранні прояви фіброзу, що є особливо важливим для хворих з субклінічним перебігом хвороби.

Опираючись на сучасні напрямки наукових досліджень, спрямованих на пошук факторів, що впливають на особливості перебігу та прогресування автоімунного гепатиту у дітей, нами вивчено та проаналізовано забезпеченість вітаміном D дітей з АГ, його зв'язок з генетичними особливостями пацієнтів та вплив на прогресування захворювання. За нашими даними 68,0% обстежених дітей з АГ мають дефіцит вітаміну D, що не співпадає з результатами дослідження проведених в Україні серед здорових дітей, за яким дефіцит вітаміну D мав місце в 88,5% дітей [74]. Варто зазначити, що це дослідження стосувалось школярів 10-17 років і проводилось в жовтні та листопаді, для виключення впливу сезонного фактору на зазначений показник. Обстежені нами діти були у віковій категорії 2-18 років та показники концентрації вітаміну D у сироватці у дітей визначались протягом року. Отримані нами результати співпадають із численними літературними даними, в яких частота дефіциту вітаміну D при захворюваннях печінки коливається від 64 до 92% [68,139]. Встановлено, що на всій території України, незалежно від регіону проживання, встановлено дефіцит вітаміну D, однак без статистично достовірної різниці ($p>0,05$). Оцінка впливу сезонного чинника на концентрацію 25(OH)D у сироватці крові дітей з АГ показала, що середній рівень вітаміну D знаходився в зоні дефіциту незалежно від пори року. Так, узимку середній рівень вітаміну D складав 12,5[8,2-18,9]нг/мл, навесні – 15,5[10,8-30,0]нг/мл, влітку 18,6 [14,0-19,3]нг/мл і восени –17,5[11,8-26,8]нг/мл. Незважаючи на відсутність достовірних відмінностей частка дітей з дефіцитом вітаміну D була найнижчою восени і складала - 70,0%, влітку – 85,0%, взимку 75,0% та 55,0% восени ($p>0,05$). Ми не встановили вірогідної різниці концентрації

25(OH)D в сироватці крові між хлопчиками і дівчатками, що відповідає літературним даним [74]. Аналіз добового раціону, обстежених нами дітей показав, що усі діти з АГ не отримують рекомендованої вікової норми кількості кальцію із харчуванням на 30-40,0%. За нашими даними забезпеченість вітаміном D не впливала на представленість та виразність клінічних симптомів АГ у обстежених дітей. Ми не встановили достовірної відмінності в забезпеченості вітаміном D між групами дітей залежно від біохімічної активності гепатиту ($p > 0,05$).

Аналіз забезпеченості вітаміном D у хворих з різною стадією фіброзу за даними морфологічного дослідження показав, що у дітей з стадією фіброзу F2 за METAVIR частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 67%, з стадією фіброзу F3- 75%, а у пацієнтів з цирозом печінки – 90,0% ($p > 0,05$). Виразний фіброз F3-F4 METAVIR підвищує ризик дефіциту вітаміну D в 7,5 раз (OR=7,5; 95% CI 1,2-46,5; RR=1,5; 95% CI 0,9-2,4; Se 75%, Sp 71,4%).

За нашими даними, забезпеченість вітаміном D залежала від гістологічної активності аутоімунного гепатиту. У хворих з ІГА < 9 балів частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 25,0% ($n=7$), а у пацієнтів з ІГА > 9 балів - 75,0% ($n = 21$) ($\chi^2 = 5,1$; $p = 0,023$).

Варто зазначити, що в групі дітей цирозом печінки ($n=19$) середня концентрація 25(OH)D складала 15,6[10–19,2]нг/мл, в той час як у групі дітей без цирозу печінки - 17[12,1–23,1]нг/мл ($p < 0,05$). У жодної дитини з ЦП не було оптимального рівня вітаміну D, тоді як у пацієнтів без ЦП його частка складала 20,0%. За результатами проведеного аналізу у дітей з ЦП достовірно частіше мав місце дефіцит вітаміну D - 89,0%, на відміну від 63,0% у хворих без ЦП ($\chi^2 = 4,74$; $p = 0,003$).

Отримані результати дослідження, з нашої точки зору пов'язані не лише із зменшеним надходженням вітаміну, а й з зниженням кишкової абсорбції вітаміну D у цих хворих, зменшенням перебування на сонці та зниженням вмісту транспортних білків в сироватці крові дітей хворих на АГ. При захворюваннях печінки порушене гідроксилювання вітаміну D [87],

синтез альбуміну, DBP (D Building a Protein) і всіх речовин, синтез яких пов'язаний з концентрацією 25(OH)D. Концентрація 25(OH)D у хворих на ЦП нормалізується після лікування вітаміном D, що вказує на те, що 25-гідроксилювання зберігається в циротичній печінці, хоча DBP помірно знижується [205,206].

Розвиток дефіциту вітаміну D при АГ пов'язано з низкою факторів: недостатньою інсоляцією, яка є одним із пускових факторів запуску автоімунних реакцій у хворих з АГ, та обмежена у пацієнтів з АГ; недостатнім споживанням кальцію з їжею (аналіз добового раціону, обстежених дітей показав, що усі діти з АГ на 30-40,0% не отримували рекомендованої вікової норми кількості кальцію із харчуванням); використанням стероїдів, що є основним патогенетичним лікуванням АГ; та жовтяницею. Жовтушність шкіри найчастіше реєструвалась в групі дітей з високою та помірною біохімічною активністю в 72,5% (n=29), при низькій та мінімальній активності гепатиту лише в 29,0% (n=5) ($\chi^2 = 9,02$; $p < 0,005$ між групою з високою та помірною та низькою та мінімальною активністю). Сукупність цих факторів та генетичні особливості пацієнтів сприяють дефіциту вітаміну D, та повинні бути врахованими у хворих з АГ.

Реалізація геномних ефектів вітаміну D відбувається за участі VDR. З цією метою молекулярно-генетичним методом, обстежено 51 дитину з АГ та досліджено поліморфні локуси ApaI, TagI, BsmI гена рецептора вітаміну D (VDR). Оцінено асоціацію поліморфних варіантів гена VDR із рівнем забезпеченості вітаміном D та стадією фіброзу у дітей хворих на автоімунний гепатит.

Проведене дослідження базується на результатах інформаційного пошуку, який підтвердив коректність проведеного нами дослідження в оцінці можливості застосування аналізу варіантів поліморфізму гена рецептора VDR у дитячій гепатології, як прогностичного маркеру несприятливого перебігу АГ з прогресуванням до цирозу печінки.

Ми встановили, що дефіцит вітаміну D у дітей з автоімунним гепатитом асоційований із: наявністю генотипу GA за поліморфним варіантом BsmI та комбінації генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR. У дітей з генотипом GA за поліморфним варіантом BsmI відмічалось достовірне зниження рівня вітаміну D в сироватці крові порівняно з генотипами AA та GG ($p < 0,05$). Отримані результати довели, що діти із комбінацією генотипів AA/TC/AA, AC/TT/GG, CC/TT/GG достовірно частіше мали вищий рівень вітаміну D в сироватці крові порівняно із дітьми із комбінацією генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR ($p < 0,05$).

Генотип CC за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR та комбінації генотипів AA/CC/AA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена були асоційовані із виразним фіброзом F3 та F4 за METAVIR у дітей хворих на автоімунний гепатит. Діти з виразним фіброзом (F3 та F4 за METAVIR) достовірно частіше мали CC генотип за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR ($p < 0,05$), та генотип AA/CC/AA за дослідженими алельними варіантами гена рецептора VDR ($p < 0,05$). За нашими даними наявність C алелі за поліморфним варіантом TagI гена VDR збільшує ризик фіброзу в 1,9 разів (OR=1,96; 95% CI 0,77-5,0; RR=1,56; 95% CI 0,81-3,0; Se 78%, Sp 34%).

Діти з генотипом GA за поліморфним варіантом BsmI гена VDR мають ризик дефіциту вітаміну D в 6,3 рази частіше в порівнянні з дітьми з генотипом AA (OR=6,3; 95% CI 0,16 -62,6; RR=1,35; 95% CI 0,9-1,9; Se 56%, Sp 83%), та в 9,3 рази в порівнянні з дітьми з генотипом GG (OR=9,3; 95% CI 1,01-85,7; RR=1,55; 95% CI 1,06-2,28; Se 53%, Sp 88%).

Діти із комбінацією генотипів AC/TC/GA мають ризик дефіциту вітаміну D в 3 рази частіше ніж діти з комбінацією генотипів AA/TC/AA (OR=3,0; 95% CI 0,3-57,6; RR=1,23; 95% CI 0,8-1,89; Se 68%, Sp 66%), та в 6,5 разів частіше ніж діти з комбінацією CC/TT/GG (OR=6,5; 95% CI 0,5-76,1;

RR=1,39; 95% CI 0,85-2,26; Se 68%, Sp 75%), за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора *VDR*.

Для верифікації діагнозу, встановлення стадії фіброзу та гістологічної активності запального процесу в печінці було проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження біоптатів печінки у 45 дітей. Усіх дітей було розподілено на 2 групи, до I увійшли діти, які не отримували ГКС до моменту проведення пункційної біопсії печінки, а дітям II групи на попередньому етапі було призначено глюкокортикоїди. За допомогою морфологічного дослідження у 67,0% хворих встановлено прогресуючий перебіг захворювання - F3 та F4 за METAVIR, з них морфологічні ознаки мультилобулярного цирозу мали 22,0% дітей вже при первинному зверненні. Помірну та високу гістологічну активність гепатиту (9-18 балів за Knodell) діагностовано в 62,0% пацієнтів. Варто зазначити, що усі діти з мінімальною та низькою гістологічною активністю отримували глюкокортикоїди на попередньому етапі лікування, до проведення пункційної біопсії печінки. В усіх біоптатах мало місце розширення портальних трактів та лімфо-плазмоцитарна інфільтрація портальних трактів та перипортальних зон. В групі дітей, які не отримували кортикостероїди на момент проведення пункційної біопсії печінки, достовірно частіше мала місце розповсюджена лімфо-плазмоцитарна інфільтрація портального тракту та перипортальної зони, а також виразна позитивна експресія маркера плазматичних клітин CD 138. У дітей, що отримували ГКС, лімфо-плазмоцитарну інфільтрацію портального тракту та перипортальної зони з позитивними маркерами CD 138 діагностовано лише у 50,0% обстежених ($\chi^2=16,07$; $p < 0,05$). Виразність цієї інфільтрації визначала гістологічну активність запального процесу в печінці [78,80]. Скупчення лімфоцитів по типу „лімфоїдних фолікулів” мало місце в 52,0% дітей I групи та не виявлено в жодній дитини другої групи ($\chi^2=13,6$; $p < 0,05$) Ацидофільні тільця Каунсильмена, мали місце у 52,0% дітей I групи та лише у 20,0% II групи ($\chi^2=6,7$; $p=0,01$). Гепатоцелюлярні розетки, які є одними з основних гістологічних характеристик АГ [80],

виявлено у 80,0% дітей I групи, та в 20,0% дітей II групи ($\chi^2=16,07$; $p < 0,01$). Помірну та високу гістологічну активність гепатиту (ІГА > 9 балів) діагностовано у 62,0 % хворих: у 82,0 % дітей I групи та 18,0 % дітей II групи ($\chi^2 = 21,2$; $p < 0,001$). Виразний фіброз >F2 за METAVIR мали 67,0% хворих. У 22,0% дітей цироз печінки був мультилобулярний, серед яких 70,0% дітей I групи. Проведений кореляційний аналіз Спірмена показав, що у I групі обстежених нами дітей має місце позитивний помірний прямий кореляційний взаємозв'язок між гістологічною активністю захворювання у балах та активністю мезенхімально-запального синдрому (тимолова проба - $p=0,001$, γ -глобуліни $p=0,006$ та IgG - $p=0,001$), що свідчить про активацію клітин ретикулоендотеліальної системи печінки імунним запаленням. У II групі встановлено помірний негативний кореляційний зв'язок між гістологічною активністю в балах та активністю цитолітичного синдрому (АЛТ - $p=0,032$, АСТ - $p=0,049$) та тимолової проби ($p=0,005$), а також помірний позитивний прямий зв'язок між гістологічною активністю та ГГТ ($p=0,02$).

За нашими даними визначення імуногістохімічного маркера CD 138, навіть при мінімальній його експресії, дає можливість встановити діагноз автоімунного гепатиту у дітей. Морфологічне дослідження проведене нами у дітей з АГ свідчить, що на фоні лікування відбувається патоморфоз АГ - зниження гістологічної активності із мінімальним виявленням позитивної експресії маркера плазмоцидів CD138, зменшення кількості ацидофільних тілець Каунсильмена, зниження здатності лімфоцитів до скупчення та утворення лімфоїдних фолікулів, відсутність розеткоутворення, які є основними гістологічними характеристиками автоімунного гепатиту [78,80].

За нашими даними результати біохімічної та гістологічної активності гепатиту не співпадають. У дітей з мінімальною та низькою гістологічною активністю в печінці у 41,0% мала місце висока біохімічна активність, а у 19,0 % дітей з високою гістологічною активністю мало місце підвищення рівнів трансаміназ до 5 норм. Таким чином, оцінка активності патологічного процесу в печінці у дітей з АГ біохімічним та гістологічним методами не є

тотожними, вони лише доповнюють один одного. Враховуючи отримані результати морфологічного дослідження та розвиток лікувального патоморфозу АГ, з нашої точки зору, пункційну біопсію печінки слід проводити до початку імуносупресивного лікування, що значно підвищує ефективність діагностики АГ у дітей.

Безперечно, пункційна біопсія печінки є одним з основних методів діагностики фіброзу печінки, однак, відомі ризики при маніпуляції та часто негативне ставлення пацієнтів і їх батьків до цієї інвазивної процедури [2], значно обмежують кількість хворих яким вона проводиться, та сприяє пошуку нових високоточних неінвазивних методів візуалізації фіброзу. Беручи до уваги важливість визначення стадії хвороби сьогодні проводиться велика кількість досліджень по розробці та впровадженню критеріїв та пошук неінвазивних і високоінформативних методів оцінки стадії фіброзу, як основного критерію прогнозу захворювання [120]. З метою визначення місця ультразвукового неінвазивного методу в оцінці стадії фіброзу усім хворим включеним в дослідження проведена еластографія зсувної хвилі паренхіми печінки. Для інтерпретації показників еластографії та визначення стадії фіброзу у хворих на АГ використали дані дослідження L.Castera та співавторів [119]. Як свідчать літературні дані, ультразвукова еластографія є точним методом для діагностики цирозу печінки. Для діагностики відмінності між легким та помірним фіброзом цей метод є менш чутливим [102,104]. Застосування еластографії для діагностики фіброзу печінки на фоні лікування АГ дозволяє оцінити потенційний ризик прогресування захворювання. За нашими даними, лише у 66,0% дітей стадія фіброзу, отримана при гістологічному дослідженні біоптатів печінки, співпадала з даними еластографії печінки. За нашими даними у дітей з автоімунним гепатитом активність запального процесу в печінці впливає на показники жорсткості паренхіми. Аналіз взаємозв'язку гістологічної активності гепатиту із показниками жорсткості паренхіми печінки показав, що в групі дітей які отримували лікування на момент проведення пункційної біопсії

печінки гістологічна активність в балах (ІГА) була достовірно нижча порівняно з хворими, які не отримували кортикостероїдів ($p < 0,05$). У хворих з АГ І групи ми встановили позитивний значимий зв'язок між ІГА, та жорсткістю паренхіми печінки – $\tau = 0,30$ ($p = 0,003$), в той час, як у пацієнтів ІІ групи мав місце слабкий недостовірний зв'язок між ІГА та жорсткістю паренхіми печінки - $\tau = 0,07$ ($p > 0,05$). Не встановлено кореляційного зв'язку між біохімічною активністю та жорсткістю паренхіми печінки, в пацієнтів обох груп ($p > 0,05$). Отримані нами результати вперше показали, що застосування ультразвукової еластографія зсувної хвилі для оцінки стадії фіброзу у дітей з АГ в період розгорнутих клінічних проявів не є доцільним, ($p < 0,05$). Через 6 та 12 місяців лікування, практично в усіх дітей вдалось досягнути нормалізації біохімічних показників та зниження показників жорсткості паренхіми печінки ($p < 0,05$).

Для оцінки впливу імуносупресивного лікування на показники жорсткості печінки ми провели аналіз впливу біохімічної активності автоімунного гепатиту на показники жорсткості паренхіми печінки через 6 та 12 місяців лікування. Різниця показників жорсткості печінки до лікування та через 6 місяців лікування складала $29,0 \pm 13,58\%$, що відображає вклад частки активності захворювання в показник жорсткості печінки. Даний статистичний аналіз підтверджений відповідно до критерія Вілкоксона ($p < 0,05$). З метою удосконалення методу оцінки стадії фіброзу печінки у пацієнтів з АГ запропоновано спосіб визначення стадії фіброзу печінки неінвазивним методом до лікування, без урахування активності запального процесу в печінці, з використанням формули. Проведений математичний аналіз діагностичної ефективності даного методу підтвердив їх високу діагностичну ефективність у встановленні стадії фіброзу у дітей з АГ (Se 75,0% Sp 17,0% PV «+» 78,26%; PV «-» 14,29%; точність 63,3%). Оптимальними термінами проведення еластографії зсувної хвилі для оцінки виразності фіброзу печінки у дітей з АГ є 6 місяців від початку імуносупресивної

терапії, за умови досягнення клініко-лабораторної ремісії, з наступним контролем через 12 місяців.

Оцінка впливу несприятливих факторів, які прискорюють прогресування автоімунного гепатиту у дітей, проводилась методом розрахунку показників відносного ризику та відношення шансів. Для підтвердження діагностичної ефективності проведений математичний аналіз методом розрахунку показників чутливості (Se), та специфічності (Sp). Оцінка впливу несприятливих факторів проводилась методом розрахунку відносного ризику (RR) та відношення шансів (OR) для показників, які мали достатньо високу специфічність та чутливість. Різницю вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

З цією метою у дітей з АГ було проаналізовано дані анамнезу, особливості клінічного перебігу, лабораторні тести, морфологічні та ультразвукові критерії, а також а також варіанти поліморфізму гену VDR у дітей з виразним фіброзом, стадія ($> F2$ за METAVIR). Серед показників включених в аналіз були: стать, вік, несвоєчасно встановлений діагноз АГ через більше ніж 12 місяців від перших проявів хвороби, наявність в родичів першого порядку автоімунних захворювань, термін початку терапії від перших ознак хвороби, наявність малих печінкових знаків: пальмарної еритеми та телеангієктазій, носові кровотечі, жовтяниця, позапечінкові прояви, основні лабораторні показники, що характеризують цитолітичний синдром (АЛТ, АСТ), мезенхімально-запальний (загальний білок, тимолова проба, IgG, γ -глобуліни до початку лікування), холестатичний синдром (білірубін, ГГТ), ехоструктурні зміни в паренхімі печінки, а саме: наявність дрібних тубулярних структур, ущільнення глісонової капсули та міжсегментарних перегородок, концентрація вітаміну D в сироватці крові, поліморфізм TagI, BsmI, ApaI гену VDR та їх комбінації; «капіляризація» синусоїди та аналіз біоптатів морфологічного дослідження печінки.

За результатами проведеного аналізу ми встановили 10 факторів які мають суттєвий зв'язок з прогресуючим перебігом АГ (стадія фіброзу > F2 за METAVIR). Результати наведені в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1.

Предиктори прогресуючого перебігу автоімунного гепатиту у дітей

Фактор	OR	95% CI (min-max)	RR	95% CI (min-max)	Se	Sp
Автоімунні захворювання у родичів першого порядку	3,4	0,85-13,5	1,4	1,01-1,93	0,57	0,85
Несвоєчасно встановлений діагноз АГ (більше 12 місяців)	6,0	1,85-20,3	1,9	1,4-3,2	0,78	0,63
Носові кровотечі	7,4	2,07-26,5	1,8	1,2-2,7	0,65	0,80
Малі печінкові знаки (пальмарна еритема, телеангіктазії)	7,3	1,8-28,62	2,4	1,08-5,7	0,90	0,45
Підвищення рівня IgG вище ВМН ,г/л	6,3	0,92-43,62	1,5	0,8-2,5	0,76	0,76
Підвищення рівня γ -глобулінів вище 25,0 г/л	6,3	0,92-43,62	1,5	0,8-2,5	0,76	0,76
Дефіцит вітаміну D, нг/мл	7,5	1,2-46,5	1,5	0,9-2,3	0,75	0,71
Наявність С алелі за поліморфним варіантом TagI гена VDR	1,96	0,77-5,0	1,5	0,81-3,0	0,78	0,34
Капіляризація синусоїдів	6,5	1,2-33,9	1,6	1,12-2,42	0,50	0,86
Проліферація дуктул	21,0	4,0-110	3,5	1,4-8,2	0,84	0,80

Наведені в таблиці дані свідчать, що наявність автоімунних захворювань у родичів першого порядку збільшує ризик мати прогресуючу стадію АГ в 3,4 рази (OR=3,4; 95% CI 0,85-13,5; RR=1,4; 95% CI 1,01-1,93; Se 57%, Sp 85%); встановлення діагнозу після появи перших симптомів через більше ніж 12 місяців збільшує ризик мати виразний фіброз в 6 разів

(OR=6,09; 95% CI 1,85-20,3; RR=1,91;95% CI 1,4-3,2; Se 78%,Sp 63%); носові кровотечі збільшують ризик прогресуючого перебігу АГ в 7,4 рази (OR=7,4; 95% CI 2,07-26,5; RR=1,85; 95% CI 1,2-2,7; Se 65%, Sp 80%); наявність малих печінкових знаків у дитини з АГ (пальмарна еритема, телеангіектазії) збільшує ризик прогресування в 7,3 рази (OR=7,3; 95% CI 1,8-28,62; RR = 2,48; 95% CI 1,08-5,7; Se 90%, Sp 45%); підвищення рівня IgG вище норми, у дітей які не отримували лікування до встановлення діагнозу, збільшувало ризик мати прогресуючу стадію фіброзу в 6,3 рази (OR= 6,3; 95% CI 0,92-43,62; RR=1,5;95% CI 0,8-2,5; Se76%, Sp 76%); підвищення рівня γ -глобулінів вище 25,0 г/л, збільшувало ризик в 6,3 рази (OR=6,3; 95% CI 0,92-43,62; RR=1,5; 95% CI 0,8-2,5; Se 76%, Sp 76%); дефіцит вітаміну D у наших пацієнтів підвищував ризик прогресування захворювання в 7,5 разів (OR=7,5; 95% CI 1,2-46,5; RR=1,5;95% CI 0,9-2,3; Se 75%,Sp 71%); наявність С алелі за поліморфним варіантом TagI (OR=1,96; 95% CI 0,77-5,0; RR=1,56; 95% CI 0,81-3,0; Se78%,Sp 34%); за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки у хворої дитини виявлено:капіляризація синусоїдів збільшує ризик прогресуючого перебігу в 6,5 разів (OR=6,5; 95% CI 1,2-33,9; RR=1,6; 95% CI 1,12-2,42; Se 50%, Sp 86,7%); проліферація дуктул - в 21 раз (OR=21,0; 95% CI 4,0-110; RR=3,5; 95% CI 1,4-8,2; Se 84%, Sp 80%).

ВИСНОВКИ

1. Автоімунний гепатит є швидко прогресуючим автоімунним захворюванням печінки, яке у разі відсутності імуносупресивної терапії призводить до швидкого розвитку цирозу печінки. Темпи прогресування автоімунного гепатиту є індивідуальними, а предиктори недостатньо вивчені. Враховуючи вплив вітаміну D на функціонування імунної системи, дисбаланс якої лежить в основі розвитку даного захворювання та прогресування гепатиту, дослідження його впливу на процеси фіброзу в печінці у дітей з АГ та визначення предикторів прогресуючого перебігу даного захворювання в дитячому віці є актуальним напрямком в дитячій гепатології і дозволить знизити ризик розвитку у них цирозу печінки.

2. Встановлено, що у 80% обстежених дітей мав місце АГ 1 типу, а у 12% - серонегативний варіант. У 32,0 % хворих діагноз встановлено на стадії цирозу печінки. У 30,0 % дітей, за даними анамнезу (родичі першого порядку мали автоімунні захворювання), встановлена спадкова схильність до автоімунних захворювань. У 60,0 % обстежених захворювання маніфестувало з клініки гострого гепатиту, а 40% хворих мали безсимптомний перебіг дебюту хвороби ($p > 0,05$). Основними клінічними симптомами АГ у дітей є інтоксикаційний синдром (100,0%), гепатоспленомегалія (67,0%) та позапечінкові прояви (63,0%), а біохімічними синдромами – цитолізу (95,0%) та мезенхімально-запальний (83,0%) .

3. Встановлено, що дефіцит вітаміну D мав місце у двох третин (68,0%) дітей з АГ, а недостатність - у 17,0%. Доведено, що гістологічна активність АГ асоційована з рівнем забезпеченості вітаміном D в сироватці крові, так у дітей з ІГА < 9 балів за Knodell частка дітей з дефіцитом вітаміну D складала 25,0% (n=7), а у пацієнтів з ІГА > 9 балів - 75,0% (n=21) ($\chi^2=5,1$; $p=0,023$). У хворих з ЦП на ґрунті АГ частка пацієнтів з дефіцитом була максимальною і складала 89,0%, на відміну від 63% у хворих без ЦП ($\chi^2= 4,74$; $p=0,003$).

4. Доведено, що діти з АГ та генотипом GA за поліморфним варіантом BsmI мають достовірно нижчу концентрацію 25(OH)D (12,44±5,52 нг/мл) в сироватці крові порівняно з генотипами AA (18,54±7,81 нг/мл) та GG (19,23±7,06 нг/мл) ($p < 0,05$). Діти з комбінаціями генотипів AC/TC/GA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена рецептора VDR мали достовірно нижчу концентрацію 25(OH)D в сироватці крові (12,54±5,71) нг/мл ніж діти із комбінацією генотипів AA/TC/AA (19,84±8,29 нг/мл), AC/TT/GG (19,57±8,72 нг/мл), CC/TT/GG (18,76±4,36 нг/мл) ($p < 0,05$). Генотип CC за поліморфним варіантом TagI гена рецептора VDR ($\chi^2=3,953$; $p < 0,05$) та комбінації генотипів AA/CC/AA за поліморфними варіантами ApaI, TagI, BsmI гена були асоційовані із виразним фіброзом F3 та F4 за METAVIR ($\chi^2=3,953$; $p < 0,05$).

5. Автоімунний гепатит у переважної більшості (67,0%) дітей характеризується виразним фіброзом $> F2$ за METAVIR з високою гістологічною активністю гепатиту (у 62,0% дітей ІГА > 9 балів за Knodell). Встановлено, що у дітей, які отримували лікування на момент проведення пункційної біопсії печінки ІГА був нижчим порівняно з хворими, які не отримували лікування ($\chi^2=21,2$; $p < 0,001$). На фоні лікування відбувається патоморфоз АГ - зниження гістологічної активності із мінімальним виявленням позитивної експресії маркера плазмоцитів CD138, зменшення кількості ацидофільних тілець Каунсильмена, зниження здатності лімфоцитів до скупчення та утворення «лімфоїдних фолікулів», відсутність розеткоутворення ($p < 0,05$).

6. Встановлено, що у хворих з автоімунним гепатитом гістологічна активність впливає на показники жорсткості паренхіми печінки. У 66,0% дітей стадія фіброзу за гістологічними даними співпадала з даними еластографії печінки. У дітей з АГ поряд із зменшенням біохімічної активності гепатиту спостерігалось зниження показників жорсткості паренхіми печінки через 6 місяців 9,2 [6,6-12,1] та 12 місяців лікування 8,1

[5,9-11,15] ($p < 0,05$). Для визначення стадії фіброзу печінки у дітей з АГ еластографію зсувної хвилі печінки доцільно проводити не раніше ніж через 6 міс від початку імуносупресивної терапії, за умови досягнення клініко-лабораторної ремісії, а оцінку жорсткості паренхіми печінки до лікування у цих хворих проводити з використанням розробленої формули.

7. Предикторами прогресуючого перебігу АГ у дітей є: наявність автоімунних захворювань у родичів першого порядку (OR=3,4; 95% CI 0,85-13,5; RR=1,4; 95% CI 1,01-1,93; Se 57%, Sp 85%); встановлення діагнозу після появи перших симптомів більше ніж через 12 місяців (OR=6,09; 95% CI 1,85-20,3; RR=1,91; 95% CI 1,4-3,2; Se 78%, Sp 63%); носові кровотечі (OR=7,4; 95% CI 2,07-26,5; RR=1,85; 95% CI 1,2-2,7; Se 65%, Sp 80%); наявність малих печінкових знаків (пальмарна еритема, телеангіектазії) (OR=7,3; 95% CI 1,8-28,62; RR=2,48; 95% CI 1,08-5,7; Se 90%, Sp 45%); , підвищення рівня IgG вище норми у дітей які не отримували лікування до встановлення діагнозу (OR=6,3; 95% CI 0,92-43,62; RR=1,5; 95% CI 0,8-2,5; Se 76%, Sp 76%); підвищення рівня γ -глобулінів вище 25,0 г/л (OR=6,3; 95% CI 0,92-43,62; RR=1,5; 95% CI 0,8-2,5; Se 76%, Sp 76%); дефіцит вітаміну D (OR=7,5; 95% CI 1,2-46,5; RR=1,5; 95% CI 0,9-2,3; Se 75%, Sp 71%); наявність C алелі за поліморфним варіантом TagI (OR=1,96; 95% CI 0,77-5,0; RR=1,56; 95% CI 0,81-3,0; Se 78%, Sp 34%); за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки у хворої дитини капіляризація синусоїдів (OR=6,5; 95% CI 1,2-33,9; RR=1,6; 95% CI 1,12-2,42; Se 50%, Sp 86,7%); проліферація дуктул (OR=21,0; 95% CI 4,0-110; RR=3,5; 95% CI 1,4-8,2; Se 84%, Sp 80%).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Предикторами прогресуючого перебігу АГ є: наявність автоімунних захворювань у родичів першого порядку; встановлення діагнозу після появи перших симптомів більше ніж через 12 місяців; носові кровотечі; наявність малих печінкових знаків (пальмарна еритема, телеангіектазії); підвищення рівня IgG вище норми до початку лікування; підвищення рівня γ -глобулінів вище 25,0 г/л; дефіцит вітаміну D; наявність С алелі за поліморфним варіантом TagI; капіляризація синусоїдів, проліферація дуктул за результатами морфологічного дослідження біоптату печінки.

2. Для попереднього визначення стадії фіброзу печінки методом еластографії зсувної хвилі у дітей з АГ до лікування необхідно використовувати наступну формулу $F = F1 - (F1 \cdot 30) / 100$,

де F1- показник еластографії печінки до лікування в кПа, 30 % - різниця показників жорсткості до лікування та на фоні лікування, F- показник еластографії печінки в кПа без урахування активності.

Оптимальним терміном виконання еластографії печінки методом зсувної хвилі для визначення стадії фіброзу у дітей з АГ є проведення дослідження через 6 місяців від початку імуносупресивної терапії, за умови досягнення клініко-лабораторної ремісії, із наступним моніторингом кожні 6 місяців для оцінки перебігу хвороби.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Лукьянова Е. М., Антипкин Ю. Г., Омельченко Л. И., Квашнина Л. В., Апуховская Л. И. Роль витамина D3 в сохранении и улучшении здоровья детей . Перинатология и педиатрия.2006; № 3: 91-96.
2. Березенко В.С. Клініко-патогенетичні особливості фіброгенезу печінки при хронічних гепатитах у дітей та шляхи його медикаментозної корекції. Дисертації на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук. Ін-т педіатрії, акушерства і гінекології АМН України м.Київ. 2007.
3. Квашніна Л.В. Особливості кальцієвого гомеостазу в дітей шкільного віку. Здоровье ребенка. 2018; Том 13. №1: 99-106.
4. Квашніна Л. В., О. В. Оніськова. Забезпеченість вітаміном D та ризик розвитку захворювань серцево-судинної системи : (огляд л-ри). Современ. педиатрия. 2011; № 5: 61-64.
5. Квашніна Л. В., Родіонов В. П., Оніськова О. В. Застосування вітаміну D та його препаратів у сучасній педіатрії. Современ. педиатрия. 2011; № 6:68-71
6. Квашніна Л. В. Нормалізація рівня вітаміну D та мікробіоценозу кишечника - обов'язкові складові неспецифічної імунопрофілактики і реабілітації дітей, що часто хворіють. Алергія у дитини. Львів, 2015; № 17/18: 22-24.
7. Омельченко Л.И., Муквич Е.Н, Лавренчук О.В. К вопросу витамин D-зависимой регуляции локальных механизмов неспецифической защиты у детей с дисплазией соединительной ткани. Здоровье ребенка. 2017; 12(8):890-894.
8. Омельченко Л. І. D-вітамінний статус і актуальні питання його корекції у хворих на ювенільний ідіопатичний артрит. Перинатология и педиатрия; 2017. № 4:115-118.
9. Мусин А.Г., Муталова Э.Г., Нигматуллина А.Э., Константинова Е.Е., Мусина Ф.С., Насибуллин И.М. Современные аспекты механизмов фиброгенеза в печени. ГБОУ ВПО «Башкирский государственный

медицинский университет» Минздрава России, г. Уфа. Медицинский вестник Башкортостана.2014;(9)3.

10. Реушева С. В., Паничева Е. А., Пастухова С. Ю., Реушев М. Ю. Значение витамина D в развитии заболеваний человека. Успехи современного естествознания. 2013; № 11:27-31.

11. Шепелькевич А.П., Дыдышко Ю.В. Роль генетического полиморфизма рецептора витамина D в норме и патологии. 2015:123-132.

12. Абатуров А.Е., Крючко Т.А., Кривуша Е.Л., Ткаченко О.Я. Нутритивная и медикаментозная коррекция дефицита кальция и витамина D у детей. Здоров'я ребенка. 2018; (13)7: 681-690.

13. Дудник В.М., Заїчко Н.В., Федчишен О.П.. Активність антимікробних пептидів та 25-гідроксиколекальциферолу у дітей, хворих на бронхіальну астму. Перинатологія та педіатрія.2017;1(69):121-125.

14. Аутоімунний гепатит: Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги. –: [http://www.moz.gov.ua/doc files/ dn_20141106_0826_dod_ukr_ag.pdf](http://www.moz.gov.ua/doc/files/dn_20141106_0826_dod_ukr_ag.pdf)

15. Клинические рекомендации. Аутоиммунный гепатит у детей. Профессиональные ассоциации. Союз педиатров России. 2016.

16. Лейшнер У. Аутоиммунные заболевания и печени и перекрестный синдром. М.: Анахарсис:2005:с. 176.

17. Ивашкин В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени. Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. Колопроктол. 2009; Т. 19. N. 2: 8–13

18. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Чередниченко Т.В.Вирусные гепатиты от А до ТTV у детей . М Новая волна.2003:с.432.

19. Степанов Ю.М., Гайдар Ю.А.,Діденко В.І. Каріометрична характеристика гепатоцитів на різних стадіях фіброзування та портальної гіпертензії у хворих на дифузні захворювання печінки. Гастроентерологія. 2015; 4 (58):62-67.

20. Губергриц Н.Б.Основы практической гепатологии: Фиброз печени. М: 2015; 29 –320.

21. Квашніна Л.В. Імуномодулюючі ефект вітаміну D у дітей. Здоров'я дитини. 2013;7:7-13.
22. Царьова О.В. Клініко-діагностичні критерії прогресування хронічних вірусних гепатитів В та С у дітей: дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : 14.01.10 "Педіатрія"; Ін-т педіатрії, акушерства і гінекології АМН України. - Київ, 2017. - 170 с.
23. Обухова, О.А. Розподіл поліморфізмів VDR-гена в українського населення та пошук їх зв'язку із розвитком атеротромботичного інсульту: автореферат канд. біолог. наук, спец.: 03.00.15 - генетика К. : ДУ Нац. науковий центр радіаційної медицини, 2014: с.20.
24. О.Г. Котенко, Д.А. Федоров, А.О. Попов, А.А. Коршак, А.В. Гриненко, А.В. Гусев. Опыт трансплантации печени от живого родственного донора в Украине. Медицина сьогодні і завтра.2011; №1-1(50-51):121-127.
25. Бабак О.Я., Колесникова Е.В. Цирроз печінки. Київ.2011: 363-373.
26. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis European Association for the Study of the Liver Journal of Hepatology. 2015. vol.63.P.971–1004.
27. Albert J Czaja. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. WJG 20th Anniversary Special Issues (11): Cirrhosis World J Gastroenterol. 2014; 20(10):P. 2515-2532, doi:10.3748/wjg.v20.i10.2515.
28. Priscila Menezes Ferri Liu, Débora Marques de Miranda et al. Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune actors. World J Gastroenterol. July 2013; Vol. 19(28):P.4455-4463. doi: 10.3748/wjg.v19.i28.4455
29. Albert J. Czaja . Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis: Current Status and Future Directions. Gut and Liver. Vol. 10, No. 2, March 2016; P. 177-203. doi: 10.5009/gnl15352.
30. Rodrigo Liberal, Diego Vergani and Giorgina Mieli-Vergani. Update on Autoimmune Hepatitis. J. of Clin. and Translational Hepatol. 2015; 3:42–52.
31. Czaj A J., Carpenter H A, Santrach P J, Moore S B. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. Gastroenterology. 1993;105:1502–1507.

32. Czaja A J, Carpenter HA, Moore S B. HLA DRB1*13 as a risk factor for type 1 autoimmune hepatitis in North American patients. *Dig Dis Sci.* 2008;53:522–528.
33. Czaja A J, Donaldson P T. Gender effects and synergisms with histocompatibility leukocyte antigens in type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97:2051–2057, DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.05921.x
34. Oo Y H, Hubscher S G, Adams D H. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatol Int.* 2010; 4(2): 475–493.
35. Boberg K. M. Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis.* 2002; 6(3):635-647. PMID: 12362572.
36. Verma S, Torbenson M, Thuluvath P J. The impact of ethnicity on the natural history of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2007; 46:1828-1835.
37. Diego Vergani and Giorgina Mieli-Vergani. Autoimmune Hepatitis: Diagnostic Criteria and Serological Testing. *Clinical Liver Disease* , 2014; Vol. 3 No. 2:38-41, doi: 10.1002/cld.321.
38. Giorgina Mieli-Vergani/Autoimmune Hepatitis in Childhood. *Clinical Liver Disease*-January. 2014;Vol 3 No 1 doi.org/10.1002/cld.296.
39. Radhakrishnan K R, Alkhouri N, Wolrley S, et al. Autoimmune hepatitis in children—impact of cirrhosis at presentation on natural history and long-term outcome. *Dig Liver Dis.* 2010;42:724-728. doi:10.1016/j.dld.2010.01.002
40. Michael P. Albert J. Czaja, et al. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis. *Hepatology.* 2010; Vol.51. No.6:1-21,doi.org/10.1002/hep.22759.
41. Lohse A.W, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2011; 55:171-182. doi: 10.1016/j.jhep.2010.12.012.
42. Liberal Rodrigo, Grant Charlotte R.; Longhi, Maria Serena; Mieli-Vergani, Giorgina. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis . In: *Autoimmunity reviews.* Vol. 13, No. 4-5, 2014; p. 435-440. doi: 10.1016/j.autrev.2013.11.009.
43. Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8:320-329. doi:10.1038/nrgastro.2011.69.

44. Gregorio G V, Portmann B, Karani J, et al. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology*. 2001; 33:544-553. doi:10.1053/jhep.2001.22131.
45. Czaja A J, Manns M P. Advances in the diagnosis, pathogenesis, and management of autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 2010; 139:58-72.
46. Strassburg C P, Manns M P. Treatment of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis*. 2009 ; 29:273-285. doi:10.1055/s-0029-1233534.
47. Rodrigo Liberal, Charlotte R. Grant, Maria Serena Longhi, Giorgina Mieli-Vergani, Diego Vergani Liberal R, et al. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis *Autoimmun Rev*. 2014; *Autoimmun Rev*.;13(4-5):435-40.
48. Tang J., Zhou C, Zhang Z J, Zheng S S. Association of polymorphisms in non-classic MHC genes with susceptibility to autoimmune hepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012; (11):125-131. doi:10.1016/S1499-3872(12)60136-2.
49. Khanh vinh quoc Luongand, Lan Thi Hoang Nguyen. The Role of Vitamin D in Autoimmune Hepatitis. *J Clin Med Res*. 2013; Dec; 5(6): 407–415.
50. Clara Gerosa, Vassilios Fanos, Daniela Fanni, Peter Van Eyken, Rossano Ambu, Sonia Nemolato at all . Liver biopsy interpretation in the differential diagnosis of autoimmune liver disease in children. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine*, 2013; 2(2) doi: 10.7363/020229.
51. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children: what is different from adult AIH? *Semin Liver Dis*. 2009; 29(3):297-306.
52. Hennes E M., Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, at all. International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology*. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. 2008. 48(1):169-76. doi: 10.1002/hep.22322.
53. Elizabeth Miletì, Philip Rosenthal, and Marion Peters. Validation and Modification of Simplified Diagnostic Criteria for Autoimmune Hepatitis in Children. *Clin Gastroenterol Hepatol*.2012; 10(4): 417–421.
54. Czaja A J. Autoimmune liver disease. *Curr Op. Gastroenterol*. 2009;25(3) 215-22. doi:10.5009/gnl15352.

55. Liberal R, Longhi MS, Mieli-Vergani G et al. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res ClinGastroenterol*. 2011; Vol.25.-P653–664.
56. Albert J Czaja. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease .*WJG 20th Anniversary SpecialIssues (11): Cirrhosis*. *World J Gastroenterol* 2014;Vol. 20(10). P. 2515-2532, doi:10.3748/wjg.v20.i10.2515.
57. Michael P. Manns and Richard Taubert. Treatment of Autoimmune Hepatitis. *Clinical Liver Disease*. January2014;3(1), doi.org/10.1002/cld.306
58. Knodell R., Ishak KG., Black WC. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981;(1): 431 – 435.
59. Fisher L, Fisher A .Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*. 2007; 5(4): 513-520 DOI:10.1016/j.cgh.2006.10.015.
60. Rasheed H., Hegazy R.A., Gawdat H.I., Mehaney D.A., et al. Serum vitamin D and vitamin D receptor gene polymorphism in mycosis fungoides patients: a case control study. *PLoS One*. 2016; 11(6). Article ID e0158014.
61. Juliana Sálvio Martins, Magda de Oliveira Palhares, Octávio Cury Mayrink Teixeira, and Mariana Gontijo Ramos. Vitamin D Status and Its Association with Parathyroid Hormone Concentration in Brazilians. *J Nutr Metab*. 2017;9056470.
62. Gascon–Barré M, Demers C, Mirshahi A, Néron S, Zalzal S, Nanci A. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology*. 2003; 37(5):1034–1042.
63. Kamen D L, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J. Mol. Med*. 2010; 88: 441–450.
64. Malham M. Jørgensen SP, Ott P, Agnholt J, Vilstrup H, Borre M, Dahlerup J F . Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology. *World J Gastroenterol*. 2011;17 (7): 922–925.
65. Annalisa Berzigotti, Laurent Castera. Update on ultrasound imaging of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*. 2013; (58):180-182.

66. Azim A, Ahmed A, Yadav S. Prevalence of vitamin D deficiency in critically ill patients and its influence on outcome: experience from a tertiary care centre in North India (an observational study). *J Intensive Care*. 2013; 1 (1): 14.
67. Peterlik M., Cross HS. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2009; 63: 1377–1386, DOI: 10.1038/ejcn.2009.105.
68. Arteh J., Narra S, Nair S . Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*.2010;55(9):2624-8. doi: 10.1007/s10620-009-1069-9.
69. D'Aldebert E, Biyeyeme Bi Mve M J, Mergey M, Wendum D, at all. Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium. *Gastroenterology*. 2009; 136 (4):1435–1443.
70. Pilz S, Tomaschitz A, März W, Drechsler C, Ritz E, at all. Cardiovascular disease and mortality.*Clin Endocrinol (Oxf)*.2011; 75 (5): 575–584.
71. Efe C, Kav T, Aydin C, Cengiz M, Imga NN, Purnak T, at all. Low Serum Vitamin D Levels Are Associated with Severe Histological Features and Poor Response to Therapy in Patients with Autoimmune Hepatitis. Article in *Digestive Diseases and Sciences-Dig Dis Sci*. 2014; 59(12):3035-42.
72. Tom D, Thacher, Bart L. Clarke Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clin Proc*. 2011 Jan; 86(1): 50–60. doi: 10.4065/ mcp.2010.0567.
73. Holick M.F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009; 19(2):73-8. doi: 10.1016/ j.annepidem. 2007. 12.001.
74. V. Povoroznyuk, P. Pludovsky.Vitamin D-deficiency and insufficiency: epidemiology, diagnostics, prevention and treatment. *Zaslavsky O.Yu.*, 2014; 256.
75. Looker A C, Dawson-Hughes at all. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone*. 2002; May;30(5):771-7. DOI: 10.1016/s8756-3282(02)00692-0.
76. Vergani D, Longhi M S, Bogdanos DP, Ma Y, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Semin Immunopathol*. 2009;(31) :421–435.
77. Michael F. Holick. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-281

78. Miao Q, Bian Z, Tang R, Zhang H, Wang Q, Huang S, et al. Emperipolesis mediated by CD8 T cells is a characteristic histopathologic feature of autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015 Jun;48(2-3):226-35.
79. Messa P, Alfieri C, Rastaldi M P. Recent insights into vitamin D and its receptor. 2011; *J Nephrol*. May-Jun; 24 Suppl 18: 30-7.
80. Boer Y.S, van Nieuwkerk C.M, Witte B.I, Mulder C.J, Bouma G, Bloemena E. Assessment of the histopathological key features in autoimmune hepatitis. 2015; *Histopathology*. (66): 351–362 doi: 10.1111/his.12558.
81. Rathish Nair. Vitamin D: The “sunshine” vitamin. Rathish Nair and Arun Maseeh. *J Pharmacol Pharmacother*.2012; 3(2): 118–126.
82. Azza A Eltayeb, Madleen Adel A Abdou, Amal M Abdel. Vitamin D status and viral response to therapy in hepatitis C infected children *World J Gastroenterol*.2015;Vol. 21(4): 1284-1291, DOI: 10.3748/wjg.v21.i4.1284.
83. Yamshchikov AV, Desai N.S, Blumberg H.M, Ziegler T.R, Tangpricha V. Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. *Endocr Pract*. 2009; 15(5):438-49.
84. Rode A, Furlanos S, Nicoll A. Oral vitamin D replacement is effective in chronic liver disease. *Gastroenterol Clin Biol*.2010 Nov; 34(11):618-20.
85. Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2010 Apr; 51(4):1158-67.
86. Barchetta I., Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, Cavallo MG. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med*. 2011 Jul 12; 9:85. doi: 10.1186/1741-7015-9-85.
87. Stokes C S, Krawczyk M, Reichel C, Lammert F, GGrünhage F. Vitamin D deficiency is associated with mortality in patients with advanced liver cirrhosis. *Eur J Clin Invest*. 2014 Feb;44(2):176-83. doi: 10.1111/eci.12205.
88. Gutierrez J A, Parikh N, Branch A D. Classical and emerging roles of vitamin D in hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis*. 2011 Nov; 31(4):387-98.

89. Putz-Bankuti C, Pilz S, Stojakovic T, Scharnagl H, Pieber TR, Trauner M, et al. Association of 25-hydroxyvitamin D levels with liver dysfunction and mortality in chronic liver disease. *Liver Int.* 2012; 32(5):845-51.
90. Mathieu C, Badenhoop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Aug; 16(6):261-6.
91. Bilzer, M, Roggel, F and Gerbes, A L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26: 1175-1186 *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver- January.* 2007; 26(10):1175-86. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x
92. Adams J S, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Feb;4(2):80-90. doi: 10.1038/ncpendmet0716.
93. Romanque P, Stickel F. Disproportionally high results of transient elastography in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int.* 2008; Vol.28:1177–1178.
94. Jörg Reichrath and Bernd Nürnberg. Cutaneous vitamin D synthesis versus skin cancer development. *Dermatoendocrinol.* 2009; 1(5): 253–261.
95. Francesko Cadario Silva Savastio, Corrado Magnani, Tiziana Cena, Veronica Pagliardini, Giorgio Bellomo, Marco Bagnati, et al. High Prevalence of Vitamin D Deficiency in Native versus Migrant Mothers and Newborns in the North of Italy: A Call to Act with a Stronger Prevention Program. *High. LoS One.* 2015; 10(6)
96. Targher G, Bertolini L, Scala L, et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(7):517-24.
97. Hanmin Wang, Weiwen Chen, Dongqing Li, Xiaoe Yin, Xiaode Zhang, Nancy Olsen, and Song Guo Zheng. Vitamin D and Chronic Diseases. *Aging Dis.* 2017; 8(3): 346–353. doi:10.14336/AD.2016.1021.
98. Diane L. Kamen and Vin Tangpricha. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl).* 2010-88(5): 441–450. doi:10.1007/s00109-010-0590-9.

99. Kamen D.L, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J. Mol. Med.*-2010; 88: 441–450.
100. Mora J R, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (9): 685–698.
101. Holick M F. Diabetes and the vitamin D connection. *Curr Diab. Rep.* 2008; 8: 393–398, PMID: 18778589.
102. Kitson M T, Roberts S K. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol.* 2012. 57(4):897-909.
103. Peterlik M., H. S. Cross. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005; Vol. 35, № 6: 290-304.
104. N Akutsu., R. Lin, Y. Bastien . Regulation of gene expression by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analog E B 1089 undergrowth inhibitory condition sinsquamous carcinoma cells. *Mol. Endocrinol.* 2010; Vol. 15, № 4: 1127-1139.
105. Vogel A, Strassburg C P, Manns M. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2002 Jan; 35(1):126-31, DOI: 10.1053/jhep.2002.30084.
106. Agnieszka Kempicska-Podhorecka, Ewa Wunsch, Tomasz Jarowicz, Joanna Raszeja-Wyszomirska, at all . Vitamin D Receptor Polymorphisms Predispose to Primary Biliary Cirrhosis and Severity of the Disease in Polish Population. *Gastroenterol Res Pract.* 2012. doi: 10.1155/2012/408723.
107. Tanaka A, Nezu S, Uegaki S, Kikuchi K, Shibuya A, Miyakawa H, at all. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with increased susceptibility to primary biliary cirrhosis in Japanese and Italian populations. *J Hepatol.* 2009; 50(6): 1202-9. doi: 10.1016/j.jhep.2009.01.015.
108. Christos Konstantakis, Paraskevi Tselekouni. Vitamin D deficiency in patients with liver cirrhosis. *Annals of Gastroenterology.* 2016; 29, 1-10.
109. Baur K, Mertens J C, Scmits J, Iwata R, Stieger B, Eloranta J J, at all. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic vitamin D receptor (NR 1H1) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver Int.* 2012;32(4):635-43. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02674.x.

110. Michael Bscheider and Eugene C. Butcher. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells. *Immunology*. - 2016- Jul; 148(3): 227–236.
111. Dighe M, Bruce M. Elastography of Diffuse Liver Diseases. *Seminars of roentgenology*. 2016; *Semin Roentgenol*. 51(4):358-366.
112. Baur, K., J. Mertens, J. Schmitt et al. Therapy response in chronic hepatitis C patients affected by common vitamin D receptor polymorphisms *J. Hepatol*. 2010; Vol. 52. P. 319–457 doi: 10.1186/s12876-017-0613-x.
113. Lange, C. M., J. Gouttenoire, [et al.]. Vitamin D receptor and JakSTAT signaling crosstalk results in calcitriol mediated increase of hepatocellular response to IFN-alpha. *J. Immunol*. 2014; Vol. 192, № 12. P. 6037-616.
114. Abu-Mouch, S., Z. Fireman [et al.]. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naïve patients . *World J. Gastroenterol*. 2011; Vol. 17, № 47: 5184-5190.
115. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; № 38. P. 1449 - 1457., 302.
116. Guido M., Ruge M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Sem. Liver Dis*. 2004; № 24: P. 89 – 97, DOI: 10.1055/s-2004-823103.
117. Colloredo G., Guido M., Sonzogni A. et al. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J. Hepatol*. 2003; № 39: 239 – 244.
118. Liwei Guo Lei Zheng, Liyang Hu, Huanhuan Zhou, Lifei Yu, Weifeng Liang. *Clinical Research*. Transient Elastography (FibroScan) Performs Better Than Non-Invasive Markers in Assessing Liver Fibrosis and Cirrhosis in Autoimmune Hepatitis Patients. *Med Sci. Monit*. 2017; Vol. 23: 5106-5112
119. Laurent Castera, Massimo Pinzani. Non-invasive assessment of liver fibrosis: are we ready? *The Lancet*. 2010; Vol. 375. No. 9724: 1419–1420
120. Castera L. Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis. *Digestive Disease . Fibrosis: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*. 2015; Vol. 33(4): 498-503.
121. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis European Association for the Study of the

Liver Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado, 2015. *J Hepatol.* 63(1): 237-64. doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.006.

122. Bjornsson E, Talwalkar J, Treeprasertsuk S, Neuhauser M, Lindor K. Patients with typical laboratory features of autoimmune hepatitis rarely need a liver biopsy for diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;P. 57–63.

123. Sagir A., Erhardt A. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology.* 2008; 47: 592–595;14.

124. Arena U, Vizzutti F, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology.* 2008; 47: 380–384.

125. Vigano M, Massironi S, Lampertico P et al. Transient elastography assessment of the liver stiffness dynamics during acute hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010; 22: 180–184; doi: 10.1097/MEG.0b013e328332d2fa.

126. Millonig G, Reimann FM, et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology.* 2008 Nov;48(5):1718-23.

127. Mueller S., Millonig G, Sarovska L et al. Increased liver stiffness in alcoholic liver disease: differentiating fibrosis from steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2010; 16: 966–972; doi: [10.3748/wjg.v16.i8.966].

128. Trabut J B, Thepot V, Nalpas B et al. Rapid decline of liver stiffness following alcohol withdrawal in heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2012; 36: 1407–1411.

129. Bardou-Jacquet E, Legros L, Soro D et al. Effect of alcohol consumption on liver stiffness measured by transient elastography. Bardou-Jacquet E. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 516–522; doi: [10.3748/wjg.v19.i4.516].

130. Detlefsen S, Sevelsted Moller L et al. Transient and 2-Dimensional Shear-Wave Elastography Provide Comparable Assessment of Alcoholic Liver Fibrosis and Cirrhosis. *Gastroenterology* 2016; 150: 123–133.

131. Cassinotto C, Boursier J, De Ledinghen V et al. Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: A comparison of Supersonic Shear Imaging, FibroScan and ARFI with liver biopsy. *Hepatology* 2016; 63: 1817–1827.

132. Zeng J., Liu GJ, Huang ZP et al. Diagnostic accuracy of two-dimensional shear wave elastography for the non-invasive staging of hepatic fibrosis in chronic

- hepatitis B: a cohort study with internal validation. *Eur Radiol.* 2014; 24: 2572–2581. doi: 10.1007/s00330-014-3292-9. Epub 2014 Jul 17.
133. Cassinotto C, Lapuyade B, Mouries A et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis with impulse elastography: comparison of Supersonic Shear Imaging with ARFI and Fibroscan. *J Hepatol.* 2014. 61: 550–557.
134. Hartl J, Denzer U, Ehlken H, Zenouzi R, Peiseler M, et al. Transient elastography in autoimmune hepatitis: Timing determines the impact of inflammation and fibrosis. 201; *J Hepatol.* 65(4):769-775.
135. Romanque P, Stickel F, Dufour J F Romanque P. Disproportionally high results of transient elastography in patients with autoimmune hepatitis. *Liver.Int.* 2008;(28): 1177–1178, doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01743.x.
136. Arena U, Vizzutti F et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008; 47: 380–384.
137. Hyung Su Ahn, Sang Gyune Kim, Yun Nah Lee, Young Seok Kim et al. The usefulness of transient elastography, acoustic-radiation-force impulse elastography, and real-time elastography for the evaluation of liver fibrosis. *Jong Ho Chung.* 2013; *ClinMolHepatol.* Vo.-19(2):156-64, doi: [10.3350/cmh.2013.19.2.156].
138. E.A. Tsochatzis, K. S. Gurusamy S.S. Ntaoula E. Cholongitas et al. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: A meta-analysis of diagnostic accuracy. *Journal of Hepatology.* 2011; 54(4):650–659.
139. Saron M L, Godoy H T, Hessel G. Nutritional status of patients with biliary atresia and autoimmune hepatitis related to serum levels of vitamins A, D and E. *Arq Gastroenterol.* 2009;46(1):62-8. PMID: 19466312.
140. Myriam Barragan, Misty Good, and Jay K. Kolls Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D Nutrients. 2015 Sep; 7(9): 8127–8151. 2015 Sep 21. doi: 10.3390/nu7095383
141. Messa P, Alfieri C, Rastaldi M P. Recent insights into vitamin D and its receptor. *J Nephrol.* 2011 May-Jun; 24 Suppl 18:S 30-7 doi: 10.5301/JN.2011.7767
142. Kmath vinhguoc Luong, LanThiHoang Nguyen. The role of vitamin D Autoimun Hepatites. *J Clin Med Res* 2013; 5(6):407-415

143. Donaldson P T, Thomson L J, Santrach P J, Moore S B, Czaja A J, Williams R, Strettell M D. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1997;112(6): 2028–2035.
144. Czaja AJ , Strettell M D, Thomson L J, Santrach P J, Moore S B, Donaldson PT, Williams R. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1997; 25(2):317–323.
145. Teufel A, Worns M, Weinmann A, Centner C, Piendl A, Lohse A W, Galle P R. et al. Genetic association of autoimmune hepatitis and human leucocyte antigen in German patients. *World J Gastroenterol*. 2006;12(34):5513–5516
146. Duarte-Rey C Pardo AL, Rodriguez-Velosa Y, et al. HLA class II association with autoimmune hepatitis in Latin America: a meta-analysis. *Autoimmun Rev*. 2009;8(4): 325–331. doi: 10.1016/j.autrev.2008.11.005.
147. Neeman R., Abramovitch S, Sharvit E, Elad-Sfadia G, Haklai R, Kloog Y, Reif S. Vitamin D and S-farnesylthiosalicylic acid have a synergistic effect on hepatic stellate cells proliferation. *Dig Dis Sci*. 2014 Oct;59(10):2462-9.
148. S Beinhart , M Eder , R Marculescu , R Strassl , A Stättermayer , J Stift , K Kozbial , C Freissmuth. High prevalence of Vitamin D deficiency in patients with autoimmune Hepatitis: impact on clinical presentation and response to treatment. *Gastroenterol* 2015; 53 – P61 DOI: 10.1055/s-0035-1551749.
149. Smyk D S, Orfanidou T, Invemizzi P, Bogdanos D P, Lenzi M Vitamin D in autoimmune liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013 Nov;37(5):535-45.
150. Sunil. J. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* January 2018;(175):60-81.
151. Silvia Zúñiga, Delphine Firrincieli, Chantal Housset, Nicolas Chignard. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2011;(35)4:295-302.
152. Marijn Speeckaert Guangming Huang Joris R. Delanghe Youri E.C. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. 2006; Pages 33-42 doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.011.

153. Bizzaro G, Antico A, Fjrtunato A, Bizzaro N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit? *Med Assoc J*, 2017;19(7):438-443. PMID: 28786260.
154. Agmon-Levin N, Theodor E, Segal RM. Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013; 45: 256-66.
155. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66: 1137-42.
156. Antico A, Tozzoli R, Giavarina D, Tonutti E, Bizzaro N. Hypovitaminosis D as predisposing factor for atrophic type A gastritis: a case-control study and review of the literature on the interaction of Vitamin D with the immune system. *Clin Rev Allergy Immunol*; 2012(42): 355-64, doi: 10.1007/s12016-011-8255-1.
157. Altieri B, Muscogiuri G, et al. Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017.
158. Manns M. P, Woynarowski M, Kreisel W, et al. Budesonide induces remission more effectively than prednisone in a controlled trial of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1198-206.
159. Novo E, Marra F, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, et al. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut*. 2006; 55:1174–1182., doi: 10.1136/gut.2005.082701.
160. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O’Byrne SM, Blaner WS, et al./ Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*. 2005; 54:142–151, DOI: 10.1136/gut.2004.042127
161. Guo J, Friedman S. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 2007;(27):413–426. DOI: 10.1055/s-2007-991517.
162. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, et al. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2007(46):297–306, DOI: 10.1002/hep.21695.

163. Vallet-Pichard A., Mallet V, Nalpas B, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and Fibrotest. *Hepatology* 2007;46:32–36, DOI:10.1002/hep.21669.
164. Taisa Grotta Ragazzo, Denise Paranagua-Vezozzo, et al. Accuracy of transient elastography-FibroScan, acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging, the enhanced liver fibrosis (ELF) test, APRI, and the FIB-4 index compared with liver biopsy in patients with chronic hepatitis C. 2017;72(9):516–525.
165. Arbour NC, Lorenz E, Schutte B C, Zabner J, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25:187–191. DOI: 10.1038/76048.
166. Luonga K, Nguyena L. The Role of Vitamin D in Autoimmune Hepatitis. *J Clin Med Res.* -2013- 5 (6): 407–415, doi: 10.4021/jocmr1505w.
167. Naoyuki Takahashi, Naoyuki Udagawa, Tatsuo Suda. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKey Reports* 2014 Feb 5;3:495.
168. Czaja A.J. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Dig. Dis. Sci.* 2012;(57): 2248-2266.
169. Manns M P., Strassburg C P. Therapeutic strategies for autoimmune hepatitis. *Dig Dis.* 2011; 29(4):411-5. doi: 10.1159/000329805. doi: 10.1159/000329805.
170. Paternostro R., Wagner D, Reiberger T, Mandorfer M, Schwarzer et al. Low 25-OH-vitamin D levels reflect hepatic dysfunction and are associated with mortality in patients with liver cirrhosis. 2017 Jan;129(1-2):8-15.
171. Malham M, Jørgensen SP, Ott P, Agnholt J, Vilstrup H, Borre M, Dahlerup J F. Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology. *World J Gastroenterol.* 2011 Feb 21;17(7):922-5.
172. Rodolphe Anty, Marie Tonohouan. Low Levels of 25-Hydroxy Vitamin D are Independently Associated with the Risk of Bacterial Infection in Cirrhotic Patients. *Clin Transl Gastroenterol.* 2014 May 29;5:e56. doi: 10.1038/ctg.2014.6.
173. Amal Mohamed Ahmed, Maha Abdel Ghany, et al. Assessment of Vitamin D status in a group of Egyptian children with non alcoholic fatty liver disease (multicenter study). *Nutr Metab (Lond).* 2016; 13: 53.

174. Adam R, McMaster P, et al. Evolution of liver transplantation in Europe: Report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl.* 2003; 9:1231-1243. DOI: 10.1016/j.lts.2003.09.018.
175. Yamashiki N , Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Takazawa Y at all. Living-donor liver transplantation for autoimmune hepatitis and autoimmune hepatitis-primary biliary cirrhosis overlap syndrome. *Hepatol Res.* 2012; 42:1016-1023.
176. Nikoletta Argentou, Georgios Germanidis, Prodromos Hytioglou, Eirini Apostolou, at all. TGF- β signaling is activated in patients with chronic HBV infection and repressed by SMAD7 overexpression after successful antiviral treatment, *Inflammation Research.* 2016;(65)5:355.
177. Tanashi Y, Matuzani K, Date M, et al. Differential regulation of TGF β 1 – signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35(1):49-60, DOI: 10.1053/jhep.2002.30083.
178. Czaja A.J. Review article: The prevention and reversal of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014 Feb;39(4):385-406.
179. Gressner A. M, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S./ Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:793–807.
180. Giorgina Mieli-Vergani, Diego Vergani, Ulrich Baumann, Piotr Czubkowski, at all. Diagnosis and Management of Pediatric Autoimmune Liver Disease: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *JPGN.* 2018;66(2).
181. Wolf D.C., Bojito L., Facciuto M., Lebovic S.E. Mycophenolate mofetil for autoimmune hepatitis: a single practice experience . *Wolf D.C. Dig. Dis. Sci.* 2009; 54(11): 2519-2522, DOI: 10.1007/s10620-008-0632-0.
182. Woynarowski M. Nemeth A, Baruch Y, et. all. Budesonide versus prednisone with azathioprine for the treatment of autoimmune hepatitis in children and adolescents. *J Pediatr* 2013;163:1347–53, doi: 10.1016/j.jpeds.2013.05.042.
183. Aw M.M., Dhawan A, et all. Mycophenolate mofetil as rescue treatment for autoimmune liver disease in children: a 5-year follow-up. *J Hepatol* 2009; 51:156–60, doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04763.

184. Zizzo A N., Valentino P L, Shah P S, et al. Second-line agents in pediatric patients with autoimmune hepatitis: a systematic review and metaanalysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 65:6–15. DOI: 10.1097/MPG.0000000000001530
185. Czaja A J, Menon KV. Sustained remission after corticosteroid therapy for type 1 autoimmune hepatitis: a retrospective analysis. *Hepatology*. 2002; 35: 890–897.
186. Ferreira A R, Roquete M L, Toppa N H, de Castro L Pat all. Effect of treatment of hepatic histopathology in children and adolescents with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008 Jan;46(1):65-70.
187. Al-Chalabi T., Heneghan M A. Remission in autoimmune hepatitis: what is it, and can it ever be achieved? / Chalabi T. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1013–5.
188. Sogo T, Fujisawa T, Inui A, et al. Intravenous methylprednisolone pulse therapy for children with autoimmune hepatitis. *Hepatology Res* 2006; 34:187–92.
189. Miyake Y , Iwasaki Y, Terada R, Onishi T, Okamoto R, Sakai N, et al. Clinical characteristics of fulminant-type autoimmune hepatitis: an analysis of eleven cases. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:1347–1353.
190. Sanchez-Urdazpal L, Czaja A J, van Hoek B, Krom R A, Wiesner R H. Prognostic features and role of liver transplantation in severe corticosteroid-treated autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992;15:215–221.
191. Priscila Menezes Ferri Liu, Débora Marques de Miranda, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune factors. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(28): 4455–4463. doi: 10.3748/wjg.v19.i28.4455.
192. Yeoman AD, Westbrook RH, Zen Y, Maninchedda P, Portmann BC, Devlin J, et al. Early predictors of corticosteroid treatment failure in icteric presentations of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2011;53:926–934, DOI: 10.1002/hep.24141.
193. Czaja AJ., Rakela J, Ludwig J. Features reflective of early prognosis in corticosteroid-treated severe autoimmune chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1988; 95:448–453.
194. Ichai P, Duclos-Vallee J C, Guettier C, Hamida SB, Antonini T et al. Usefulness of corticosteroids for the treatment of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. *Liver Transpl* 2007;(13):996–1003, DOI: 10.1002/lt.21036.

195. Mieli-Vergani G, Vergani D. Budesonide for juvenile autoimmune hepatitis? Not yet. *J Pediatr* 2013;163:1246–8, doi: 10.1016/j.jpeds.2013.06.064.
196. Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang M H, Fujisawa T, et al. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr gastroenterol Nutr* 2009;49:158–64.
197. Burak KW, Urbanski S J, Swain MG. Successful treatment of refractory type 1 autoimmune hepatitis with methotrexate. *J Hepatol.*1998; 29:990–993.
198. Burak KW, Swain MG, Santodomingo-Garzon T, Lee SS, Urbanski SJ et al. Rituximab for the treatment of patients with autoimmune hepatitis who are refractory or intolerant to standard therapy. *Can J Gastroenterol.*2013; 27:273–280.
199. Weiler-Normann C, Schramm C, Quaas A, Wiegard C, Glaubke C, Pannicke N, et al. Infliximab as a rescue treatment in difficult-to treat autoimmune hepatitis. *J Hepatol.*2013; 58:529–534, doi: 10.1016/j.jhep.2012.11.010. Epub 2012 Nov 21.
200. Dehghani S M, Haghghat M, Imanieh M H, et. al. Autoimmune hepatitis in children: experiences in a tertiary center. *Iran J Pediatr.* 2013;23(3):302-8.
201. Jimenez-Rivera C, Ling S C, Ahmed N, et al. Incidence and characteristics of autoimmune hepatitis. *Pediatrics* 2015;136:1237–48. doi: 10.1542/peds.2015-0578.
202. Amarapurkar D, Dharod M, Amarapurkar A. Autoimmune hepatitis in India: single tertiary referral centre experience. *Trop Gastroenterol* 2015;36: 36–45.
203. Abu Faddan N H, Abdel-Baky L, Aly SA. Clinico-laboratory study on children with auto-immune hepatitis in Upper Egypt. *Arab J Gastroenterol* 2011;12(4):178–83. doi: 10.1016/j.ajg.2011.11.003.
204. Wendy Dankers, Edgar M. Colin, Jan Piet van Hamburg, Erik Lubberts. Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2016;7: 697. doi: 10.3389 / fimmu. 2016. 00697
205. Naoyuki Takahashi, Naoyuki Udagawa, Tatsuo Suda/ Vitamin D endocrine system and osteoclasts, 2014 *Bonekey Rep.* ;3:495. doi: 10.1038/bonekey.2013.229.
206. Jörg Reichrath and Bernd Nürnberg. Cutaneous vitamin D synthesis versus skin cancer development The Janus faces of solar UV-radiation. *Dermatoendocrinol.* 2009 Sep-Oct; 1(5): 253–261. PMID: PMC2836430.

ДОДАТОК 1

ПЕРЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Березенко В.С., Михайлюк Х.З. Особливості маніфестації автоімунного гепатиту у дітей. Сучасна педіатрія. 2017; 6(86):80-87.
2. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Шадрін В.О., Крат В.В. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей з автоімунним гепатитом. Перинатологія і педіатрія. 2018;1(73):92-98.
3. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Келихевич С.М. Лікувальний патоморфоз автоімунного гепатиту у дітей. «Art of medicine». 2018;3(7): 54-59.
4. Березенко В. С., Задорожна Т. Д., Михайлюк Х. З., Тарасюк Б. А., Коробко В. Ф., Келихевич С. М. Морфологічні та ультразвукові особливості фіброзу печінки в дітей з автоімунним гепатитом. Патологія. 2018. Т. 15, 3(44): 330–336 DOI: 10.14739/2310-1237. 2018.3.1518155.
5. Березенко В.С. Можливості поєднання неінвазивних методів для оцінки стадії фіброзу печінки у дітей із хронічним гепатитом С. Березенко В.С., Диба М.Б., Михайлюк Х.З., Ткалик О.М., Крат В.В., Тарасюк Б.А. Коробко В.Ф. Сучасна педіатрія. 6(94)/2018- С. 14-22.
6. Berezenko V. S. Correlation of polymorphous variants (ApaI, TagI, BsmI) of the VDR receptor gene with the vitamin D level and liver fibrosis in children with autoimmune hepatitis/V. S. Berezenko, H. Z. Mykhailiuk, Z. I. Rossokha, S. P. Kyriachenko // Zaporozhye medical journal 2019; 21 (4), 458–465 DOI: 10.14739/2310-1210.2019.4.173196.
7. Березенко В.С. Михайлюк Х.З. Диба М.Б. Палкін А.Ю. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей хворих на автоімунний гепатит. Актуальні проблеми педіатрії. Матеріали XIII з'їзду педіатрів України (11-13 жовтня 2016 р., м. Київ). Міжнародний журнал педіатрії, акушерства та гінекології 2016 Том 10 №1:25-26.

8. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Дибба М.Б., Крат В.В. Особливості забезпеченості вітаміном D дітей, хворих на автоімунний гепатит. *Vol', sustavy, rozvonočnik*. 2017;7(4):200-205. doi: 10.22141/2224-1507.7.4.2017.121233.

9. Михайлюк Х.З. Морфологічні особливості автоімунного гепатиту у дітей. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25 річчю Національної Академії медичних наук України, (м. Київ, 2018). «Журнал НАМН України», Спеціальний випуск, 2018, ст.163.

10. Березенко В.С. Михайлюк Х.З., Дибба М.Б., Крат В.В., Ткалик О.М. / Зв'язок забезпеченості вітаміном D у дітей з автоімунним гепатитом з поліморфними варіантами (ApaI, TagI, Bsml) гена рецептора вітаміну D (VDR)/ Матеріали VIII Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» м.Київ, 17-19 квітня 2019р С.148.

11. Дикан І.М., Тарасюк Б.А., Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Коробко В.Ф. Винахідники; Державна установа «Інститут ядерної медицини та променевої діагностики НАМН України», Державна установа «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України» патентовласники. Спосіб діагностики автоімунних захворювань печінки у дітей. Патент на корисну модель № 130181; № u201806393; Заявка 07.06.2018; опубл. 26.11.2018. Бюл. № 22.

12. Березенко В.С., Михайлюк Х.З., Задорожна Т.Д., Тарасюк Б.А., Коробко В.Ф. Винахідники. Державна установа «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М.Лук'янової НАМН України» патентовласник. Спосіб оцінки фіброзу печінки у дітей з автоімунним гепатитом Патент на корисну модель 131392; № u201808143; Заявка 23.07.2018; опубл. 10.01.2019. Бюл. № 1.

ДОДАТОК 2

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ

Основні положення та результати дисертаційної роботи були представлені та обговорені на: XVIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання педіатрії» (Сидельниковські читання) (м. Львів, 2016р); Науково-практична конференція «Актуальні питання дитячої гепатології» (м. Київ, 2016); II Науковому конгресі з міжнародною участю «Актуальні питання дитячої гастроентерології», (Київ,2016); 19 Конгрес Словенських і чеських остеологів, (м. Жиліна, Словачія, 2016); Науково-практична конференція «Актуальні питання дитячої гастроентерології» (м.Київ, 2017); Науково-практична конференція «Актуальні питання дитячої гепатології» (м.Київ, 2017); Українсько-Білоруська міжнародна конференція «Дефіцит та недостатність вітаміну D у клінічній практиці», (м.Чернігів, 2017); XII Конгресі Педіатрів України «Актуальні проблеми педіатрії» (м.Київ,2017); Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання дитячої гепатології», (м.Київ, 2018); Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25 річчю Національної Академії медичних наук України, (м. Київ, 2018); X конгресі Асоціації патологів України «Перспективи розвитку сучасної патології», (м. Івано-Франківськ – м.Яремче, 2018); Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної ультразвукової діагностики», (м. Київ, 2018), VIII Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (м. Київ, 2019р); Науково-практична конференція з міжнародною участю Актуальні питання сучасної ультразвукової діагностики (м. Одеса,2019).