

---

DOCTORAL THESIS SYNOPSIS

# Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: non-invasive assessment of disease progression

---

Doctoral Student: **Mădălina-Gabriela INDRE**

---

Supervisors: **Prof. Dr. Lucia Maria PROCOPCIUC**  
**Prof. Dr. Fabio PISCAGLIA (joint PhD)**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

## SUMMARY

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCTION</b>  | 15 |
| <b>THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>  | 17 |
| <b>1. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)</b>   | 19 |
| <b>2. Liver ultrasound elastography</b>  | 21 |
| 2.1. Vibration-controlled transient elastography (VCTE)  | 21 |
| 2.1.1. Performance of VCTE for liver fibrosis evaluation in MASLD  | 23 |
| 2.1.2. Assessing liver steatosis through the controlled attenuation parameter (CAP)  | 24 |
| 2.2. Two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE)  | 25 |
| 2.2.1. Effectiveness of 2D-SWE in Predicting Liver Stiffness in MASLD  | 26 |
| 2.2.2. Evaluation of hepatic steatosis in MASLD using 2D-SWE techniques  | 27 |
| 2.2.3. Evaluation of hepatic inflammation in MASLD using 2D-SWE techniques   | 28 |
| <b>3. Ultrasound elastography-based scores with applicability in MASLD</b>   | 29 |
| 3.1. Agile 3+ and Agile 4 Scores for the identification of advanced fibrosis and cirrhosis in suspected MASLD  | 29 |
| 3.2. The Fibroscan-AST (FAST) Score for the identification of at-risk MASH   | 29 |
| <b>4. Disease progression to MASLD-related hepatocellular carcinoma (HCC). Possibilities for optimizing screening strategies using ultrasound elastography</b>                               | 31 |
| <b>5. Disease progression to clinically significant portal hypertension (CSPH). Prevention of first decompensation event</b>   | 35 |
| <b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>   | 37 |
| <b>1. Work hypothesis/objectives</b>   | 39 |
| <b>2. General methodology</b>  | 41 |
| <b>3. Study 1 - FAST and Agile–the MASLD drift: Validation of Agile 3+, Agile 4 and FAST scores in 246 biopsy-proven NAFLD patients meeting MASLD criteria of prevalent Caucasian origin</b> | 47 |
| 3.1. Introduction  | 47 |
| 3.2. Work hypothesis/ objectives   | 48 |
| 3.3. Material and methods  | 48 |
| 3.4. Results   | 51 |
| 3.5. Discussions   | 59 |
| 3.6. Conclusions   | 63 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>4. Study 2 - Diagnostic accuracy of two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE) ultrasound for liver fibrosis assessment in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): A multi-level random effects model meta-analysis</b>   | 65  |
| 4.1. Introduction  | 65  |
| 4.2. Work hypothesis/ objectives   | 66  |
| 4.3. Material and methods  | 66  |
| 4.4. Results   | 70  |
| 4.5. Discussions   | 85  |
| 4.6. Conclusions   | 87  |
| <b>5. Study 3 - The effectiveness of non-selective <math>\beta</math>-blockers in preventing the first decompensation event in patients with compensated cirrhosis enduring clinically significant portal-hypertension (CSPH) after etiological treatment. Diabetes mellitus as independent risk factor for first decompensation event</b> | 89  |
| 5.1. Introduction  | 89  |
| 5.2. Work hypothesis/ objectives   | 90  |
| 5.3. Material and methods  | 90  |
| 5.4. Results   | 93  |
| 5.5. Discussions   | 99  |
| 5.6. Conclusions   | 102 |
| <b>6. General discussions</b>  | 103 |
| <b>7. General conclusions</b>  | 105 |
| <b>8. The originality and innovative contributions of the thesis</b>   | 107 |
| <b>REFERENCES</b>  | 111 |
| <b>ANNEXES</b>   | 121 |

**Keywords:** metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), liver fibrosis, ultrasound elastography, liver imaging, two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE)

## LIST OF PUBLICATIONS

### Articles published in full text as a result of doctoral research, first author:

1. **Taru MG**, Neamti L, Taru V, Procopciuc LM, Procopet B, Lupsor-Platon M. How to Identify Advanced Fibrosis in Adult Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) Using Ultrasound Elastography—A Review of the Literature and Proposed Multistep Approach. *Diagnostics*. 2023 Feb 19;13(4):788. (**ISI IF 3, Q1**) (Chapter 1, The current state of knowledge)
2. **Taru MG**, Lupsor-Platon M. Exploring Opportunities to Enhance the Screening and Surveillance of Hepatocellular Carcinoma in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) through Risk Stratification Algorithms Incorporating Ultrasound Elastography. *Cancers*. 2023 Aug 14;15(16):4097. (**ISI IF 4.5, Q1**) (Chapter 1, The current state of knowledge)
3. **Taru MG**, Tefas C, Neamti L, Minciuna I, Taru V, Maniu A, Rusu I, Petrushev B, Procopciuc LM, Leucuta DC, Procopet B, Ferri S, Lupsor-Platon M, Stefanescu H. FAST and Agile—the MASLD drift: Validation of Agile 3+, Agile 4 and FAST scores in 246 biopsy-proven NAFLD patients meeting MASLD criteria of prevalent caucasian origin. *PloS one*. 2024 May 23;19(5): e0303971. (**ISI IF 2.9, Q1**) (Personal contribution, Chapter 3)
4. Turco L\*, **Taru MG\***, Vitale G, Stefanescu H, Mirici Cappa F, Berardi S, Baldan A, Di Donato R, Pianta P, Vero V, Vizioli L, Procopciuc LM, Procopet B, Morelli MC, Piscaglia F.  $\beta$ -blockers lower first decompensation in patients with cirrhosis and enduring portal hypertension after etiological treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2024 Aug 27:S1542-3565(24)00780-8. Epub ahead of print. (**ISI IF 11.6, Q1**) (Personal contribution, Chapter 5)
  - a. \*Observation: Turco L (Internal Medicine Unit for the Treatment of Severe Organ Failure, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Italy, and Taru MG (Faculty of Medicine, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania) share first authorship
5. **Taru MG**, Leucuta DC, Lupsor-Platon M, Turco L, Ferri S, Hashim A, Orasan OH, Procopet B, Stefanescu H, Morelli MC, Piscaglia F, Ravaioli F. Diagnostic accuracy of 2D-SWE ultrasound for liver fibrosis assessment in MASLD: A multi-level random effects model meta-analysis. *Hepatology*. 2024 Dec 16. Epub ahead of print. (**ISI IF 12.9, Q1**) (Personal contribution, Chapter 4)

## INTRODUCTION

This doctoral thesis is the result of a joint PhD program between the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, Romania, under the supervision of Prof. Dr. Lucia Maria Procopciuc, and Alma Mater Studiorum University of Bologna, Bologna, Italy, under the guidance of Prof. Fabio Piscaglia. The central focus of this thesis was the metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), a liver condition that has seen rising prevalence and incidence in recent years, making it the most common type of liver disease today.

The progression of MASLD to more advanced stages, such as advanced fibrosis and cirrhosis, significantly increases the risk of developing important events in the course of the disease. Predicting disease progression through non-invasive methods represents a dynamic and highly relevant field of research with significant implications for patient care.

Therefore, a part of my clinical research focused on deepening our understanding of the progression of MASLD to the more advanced stages by using non-invasive ultrasound-based elastography techniques, including vibration-controlled transient elastography (VCTE), VCTE-based scores, and two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE).

I validated the VCTE-based scores—Agile 3+, Agile 4, and FAST scores—within a cohort of individuals of Caucasian descent for the very first time. Utilizing a multi-level random effects model meta-analysis, I established standardized cut-off values for 2D-SWE that distinguish between different stages of liver fibrosis in patients with biopsy-proven MASLD, applicable at varying pre-test probabilities. These cut-off values are designed for use in both primary care and specialized healthcare settings.

Additionally, I investigated the benefits of the treatment with non-selective beta-blockers (NSBB) in patients with compensated cirrhosis, emphasizing its role in preventing the first decompensation event. Notably, I demonstrated that patients with small gastroesophageal varices and porto-systemic shunts can also derive significant benefits from this treatment. My research demonstrated that the presence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) acts as an independent risk factor for the onset of the first decompensation event, regardless of etiology.

## THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), previously known as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), poses a growing challenge for healthcare systems due to its increasing prevalence. Recent data shows a rise from 25.5% in 2005 to 37.8% in 2016, with 25% of cases progressing to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) within three years. MASH accounts for 12% of liver transplants in Europe and can lead to severe liver complications, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Historically diagnosed through liver biopsy, MASLD's multifactorial nature and biopsy limitations have spurred the need for non-invasive diagnostic methods. Fibrosis stage remains a critical predictor of mortality, highlighting the importance of early detection and monitoring. Advances in non-invasive tests,

particularly ultrasound elastography, are revolutionizing diagnostics by reducing biopsy reliance and enhancing surveillance strategies.

All liver diseases cause structural changes that affect biomechanical properties, measurable through elastography. This can be done using ultrasound-based techniques such as vibration-controlled transient elastography (VCTE) and two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE).

Recently developed and validated VCTE-based scores, Agile 4 and Agile 3+, are designed to identify cirrhosis (F4) and advanced fibrosis ( $\geq$ F3), respectively, in patients with MASLD, particularly within specialized liver clinics; yet they were not validated yet in specific populations, such as those of Caucasian descent. The FibroScan-AST (FAST) score was developed and validated in 2020 for the non-invasive identification of patients with MASH who have significant activity and fibrosis.

Even though the use of 2D-SWE for non-invasive liver fibrosis assessment has rapidly increased, it still lacks cut-off standardization and robust validation.

Clinically significant portal hypertension (CSPH), a primary factor in cirrhosis decompensation, is characterized by a hepatic venous pressure gradient (HVPG) of 10 mmHg or higher. An HVPG value  $\geq$ 10 mmHg identifies patients with compensated advanced chronic liver disease (cACLD) at elevated risk of decompensation, this being of utmost importance for disease management and prognosis. Recent observations suggest that patients with advanced MASLD may face a higher prevalence of portal hypertension-related decompensation events at any given hepatic venous pressure gradient (HVPG) compared to patients with other etiologies. Moreover, decompensation in advanced MASLD may occur at lower HVPG levels compared to patients with other liver disease etiologies.

The adaptation of this knowledge for advanced MASLD and MASH is currently an active area of research.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

**Study 1: FAST and Agile—the MASLD drift: Validation of Agile 3+, Agile 4 and FAST scores in 246 biopsy-proven NAFLD patients meeting MASLD criteria of prevalent Caucasian origin**

**Work hypothesis/ objectives:** The study aimed to evaluate the effectiveness of Agile 3+, Agile 4, and FAST scores in distinguishing advanced fibrosis ( $\geq$ F3), cirrhosis (F4), and fibrotic MASH (MASH + NAS  $\geq$ 4 + F  $\geq$ 2) within a cohort of biopsy-proven MASLD patients from a tertiary medical center in Cluj-Napoca, Romania. Our specific objectives were to assess the performance of Agile 3+ in predicting advanced fibrosis ( $\geq$ F3), Agile 4 in predicting cirrhosis (F4), and the FAST score in identifying fibrotic MASH, and to determine whether these scores provide better diagnostic accuracy than the existing NITs in these scenarios.

**Material and methods:** A cohort of 246 patients with MASLD from the Medical 3 Clinic in Cluj-Napoca, Romania, was retrospectively followed during the period from January 2007 to July 2023. The diagnostic performance of Agile 3+, Agile 4, and FAST scores was assessed through AUROC curves, and the DeLong test was employed to compare the diagnostic performance of these indices. Concordance between "grey zones" was examined using McNemar's test, with statistical significance set at  $p < 0.05$ .

**Results:** Among 246 patients, 113 (45.9%) were women, and 75 (30.5%) presented diabetes. Agile 3+ and Agile 4 demonstrated excellent performance in identifying  $\geq$ F3 and F4, achieving AUROCs of 0.909 and 0.968, while the FAST score yielded acceptable results in distinguishing fibrotic NASH. When compared to FIB-4 and LSM-VCTE, both Agile 3+ and Agile 4 performed better than FIB-4 and had a similar performance to LSM-VCTE, but with higher diagnostic accuracy, hence reducing the grey zone.

**Conclusions:** Agile 3+ and Agile 4 are reliable, non-invasive tests for identifying advanced fibrosis or cirrhosis in MASLD patients, while FAST score demonstrated moderate performance in identifying fibrotic NASH.

## **Study 2: Diagnostic accuracy of two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE) ultrasound for liver fibrosis assessment in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): A multi-level random effects model meta-analysis**

**Work hypothesis/ objectives:** The aim of this study was to conduct a systematic review and meta-analysis using a multi-level random effects model to assess the diagnostic accuracy of 2D-SWE in patients with biopsy-proven MASLD. We aimed to establish reliable cut-off values for different stages of liver fibrosis that could be effectively applied in clinical practice.

**Material and methods:** The primary outcome was the diagnostic accuracy of 2D-SWE for different stages of liver fibrosis in MASLD patients. Subgroup analyses considered ultrasound manufacturer, patient demographics, and comorbidities. A bivariate logit-normal random effects model was used to estimate pooled sensitivity, specificity, and AUROC. A multiple threshold model facilitated the analysis of studies reporting more than one cut-off, while enabling the calculation of positive and negative predictive values for different pre-test probabilities.

**Results:** 20 observational studies (SuperSonic Imagine, General Electric Healthcare, Canon Medical Systems) fulfilled the inclusion criteria, comprising 2223 participants with biopsy-proven MASLD. The prevalence of mild fibrosis (F1), significant fibrosis (F2), advanced fibrosis (F3), and cirrhosis (F4) were 30.0%, 18.5%, 17.9%, and 10.9% , respectively. The sAUCs [95% CI] in detecting  $\geq$ F1,  $\geq$ F2,  $\geq$ F3, and F4 were 0.82 [0.16-0.98], 0.82 [0.76-0.88], 0.86 [0.77-0.93], and 0.89 [0.80-0.95], respectively. The optimal cut-off values were 6.432 kPa for  $\geq$ F1, 8.174 kPa for  $\geq$ F2, 9.418 kPa for  $\geq$ F3, and 11.548 kPa for F4, respectively.

**Conclusions:** Our meta-analysis identified optimized cut-offs for fibrosis staging by 2D-SWE in etiology-specific chronic liver diseases (MASLD), with excellent diagnostic performance, underscoring the potential for standardizing cut-off values.

### **Study 3. The effectiveness of non-selective $\beta$ -blockers in preventing the first decompensation event in patients with compensated cirrhosis enduring clinically significant portal-hypertension (CSPH) after etiological treatment. Diabetes mellitus as independent risk factor for first decompensation event**

**Work hypothesis/ objectives:** The study aimed to evaluate the impact of non-selective beta-blockers (NSBB) on the first occurrence of decompensation in patients with cirrhosis and clinical evidence of persistent clinically significant portal hypertension (CSPH) two years post-etiological treatment. We sought to identify independent risk factors contributing to the initial decompensation event in different etiologies, including MASLD, thus providing a clearer understanding of disease progression and potential intervention points.

**Material and methods:** A cohort of 406 patients with compensated liver cirrhosis from the Sant'Orsola Polyclinic in Bologna, Italy, was retrospectively followed during the period from 2017 to 2020. Multivariable Cox regression analyses were conducted to identify predictors of decompensation and bacterial infections, with hazard ratios and 95% confidence intervals reported. ROC curve analysis was used to evaluate the performance of continuous parameters, with statistical significance set at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was conducted using IBM SPSS (version 29), and R software.

**Results:** During a mean follow-up of 32 months, 127 (31%) patients decompensated, with ascites being the most common (77%) decompensating event. Decompensation rates were lower in patients on NSBBs (16% vs 44%;  $P < .0001$ ). At Cox regression analysis, hemoglobin, Child-Pugh, Model for End-Stage Liver Disease–Sodium, diabetes at baseline, and previous bacterial infections were independent predictors of decompensation, while NSBBs use had a protective effect (hazard ratio, 0.32; 95% confidence interval, 0.20–0.49;  $P < .0001$ ).

**Conclusions:** NSBBs decrease the risk of first decompensation in patients with cirrhosis and enduring CSPH after etiological treatment.

## **GENERAL CONCLUSIONS**

In conclusion, Study 1 provides a comprehensive evaluation of several non-invasive diagnostic tests (NITs) in the context of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MASLD). The validation of Agile 3+, Agile 4, and FAST scores in distinguishing various stages of liver fibrosis in Caucasian patients with biopsy-confirmed MASLD highlights their potential utility in clinical practice, particularly in enhancing diagnostic accuracy and reducing indeterminate results. Additionally, Study 2 supports the broad applicability of two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE) for assessing different stages of liver fibrosis in biopsy-proven MASLD, emphasizing the need for careful consideration of individual patient factors and machine performance variations to ensure accurate evaluations. The findings presented in Study 3 underscore the clinical significance of non-selective beta-blockers (NSBB) in preventing decompensating events in patients with compensated cirrhosis, including those with MASLD-related cirrhosis and persistent clinically significant portal hypertension (CSPH). Study 3 also underscores



the significance of factors included in the new definition of MASLD, such as type 2 diabetes mellitus, and their impact on disease progression and the risk of decompensation, regardless etiology. The interaction between NSBB and decompensation triggers, such as the presence of T2DM, or bacterial infections, suggest potential benefits that extend beyond their primary hemodynamic effects.

These conclusions collectively enhance our understanding of MASLD and its management, paving the way for improved patient outcomes through more informed clinical decision-making.

## **THE ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTION OF THE THESIS**

**Validation of Diagnostic Scores:** This research was the first to validate Agile 3+, Agile 4, and FAST scores for identifying liver fibrosis stages in biopsy-proven MASLD patients of Caucasian origin. The study confirmed and established new cut-off values, significantly reducing the “grey zone” compared to standard LSM-VCTE cut-offs.

**Meta-Analysis of 2D-SWE:** A multi-level random effects model meta-analysis of 2D-SWE in biopsy-proven MASLD (2,223 subjects) demonstrated excellent diagnostic accuracy and established standardized cut-off values.

**Impact of Non-Selective Beta-Blockers (NSBB):** NSBB significantly reduced the risk of first decompensation in compensated cirrhosis with CSPH, even after etiological treatment, including MASLD cases. Patients on NSBB had a lower decompensation rate (16%) compared to those off NSBB (44%). Type 2 diabetes mellitus was identified as an independent predictor of liver disease progression and decompensation, alongside bacterial infections.

---

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

# Boala de ficat gras asociată disfuncției metabolice: evaluarea non-invazivă a progresiei

---

Doctorand: **Mădălina-Gabriela INDRE**

---

Conducători de doctorat: **Prof. Dr. Lucia Maria PROCOPCIUC**  
**Prof. Dr. Fabio PISCAGLIA (cotutelă)**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCERE</b>   | 15 |
| <b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>   | 17 |
| <b>1. Boala de ficat gras asociată disfuncției metabolice (MASLD)</b>  | 19 |
| <b>2. Elastografia ultrasonografică hepatică</b>   | 21 |
| 2.1. Elastografia tranzitorie controlată prin vibrații (VCTE)  | 21 |
| 2.1.1. Performanța VCTE pentru evaluarea fibrozei hepatice în MASLD  | 23 |
| 2.1.2. Evaluarea steatozei hepatice prin parametrul de atenuare controlată (CAP)   | 24 |
| 2.2. Elastografia cu unde de forfecare bidimensionale (2D-SWE)   | 25 |
| 2.2.1. Eficacitatea 2D-SWE în predicția rigidității hepatice în MASLD  | 26 |
| 2.2.2. Evaluarea steatozei hepatice în MASLD folosind tehnici 2D-SWE   | 27 |
| 2.2.3. Evaluarea inflamației hepatice în MASLD folosind tehnici 2D-SWE   | 28 |
| <b>3. Scoruri bazate pe elastografie ultrasonografică aplicabile în MASLD</b>  | 29 |
| 3.1. Scorurile Agile 3+ și Agile 4 pentru identificarea fibrozei avansate și a cirozei în MASLD  | 29 |
| 3.2. Scorul Fibroscan-AST (FAST) pentru identificarea MASH la risc   | 29 |
| <b>4. Progresia bolii către carcinomul hepatocelular (HCC) asociat MASLD. Posibilități de optimizare a strategiilor de screening utilizând elastografia ultrasonografică</b>   | 31 |
| <b>5. Progresia bolii către hipertensiunea portală clinic semnificativă (CSPH). Prevenirea primului episod de decompensare</b>   | 35 |
| <b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>   | 37 |
| <b>1. Scop / Obiective generale</b>  | 39 |
| <b>2. Metodologie generală</b>   | 41 |
| <b>3. Studiul 1 - FAST și Agile în MASLD: Validarea scorurilor Agile 3+, Agile 4 și FAST pe o cohortă de 246 de pacienți cu NAFLD confirmată prin biopsie, respectând criteriile de diagnostic pentru MASLD, și de origine prevalentă caucaziană</b> | 47 |
| 3.1. Introducere   | 47 |
| 3.2. Scop / Obiective  | 48 |
| 3.3. Material și Metode  | 48 |
| 3.4. Rezultate   | 51 |
| 3.5. Discuții  | 59 |
| 3.6. Concluzii   | 63 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>4. Studiul 2 - Acuratețea diagnostică a elastografiei cu unde de forfecare bidimensionale (2D-SWE) pentru evaluarea fibrozei hepatice în boala hepatică steatozică asociată cu disfuncția metabolică (MASLD): O meta-analiză cu model de efecte aleatorii pe mai multe niveluri</b>  | 65  |
| 4.1. Introducere  | 65  |
| 4.2. Scop / Obiective   | 66  |
| 4.3. Material și metode   | 66  |
| 4.4. Rezultate  | 70  |
| 4.5. Discuții   | 85  |
| 4.6. Concluzii  | 87  |
| <b>5. Studiul 3 - Eficacitatea beta-blocantelor nonselective în prevenirea primului episod de decompensare la pacienții cu ciroză compensată și hipertensiune portală semnificativă clinic (CSPH) după tratamentul etiologic. Diabetul zaharat ca și factor de risc independent pentru instalarea primului episod de decompensare</b> | 89  |
| 5.1. Introducere  | 89  |
| 5.2. Scop / Obiective   | 90  |
| 5.3. Material și metode   | 90  |
| 5.4. Rezultate  | 93  |
| 5.5. Discuții   | 99  |
| 5.6. Concluzii  | 102 |
| <b>6. Discuții generale</b>   | 103 |
| <b>7. Concluzii generale</b>  | 105 |
| <b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale</b>  | 107 |
| <b>REFERINȚE</b>  | 111 |
| <b>ANEXE</b>  | 121 |

**Cuvinte cheie:** boala hepatică steatozică asociată cu disfuncția metabolică (MASLD), fibroza hepatică, elastografia cu ultrasunete, imagistica hepatică, elastografia cu unde de forfecare bidimensionale (2D-SWE)

## LISTA DE PUBLICAȚII

### Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale:

1. **Taru MG**, Neamti L, Taru V, Procopciuc LM, Procopet B, Lupsor-Platon M. How to Identify Advanced Fibrosis in Adult Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) Using Ultrasound Elastography— A Review of the Literature and Proposed Multistep Approach. *Diagnostics*. 2023 Feb 19;13(4):788. (**ISI IF 3, Q1**) (Chapter 1, The current state of knowledge)
2. **Taru MG**, Lupsor-Platon M. Exploring Opportunities to Enhance the Screening and Surveillance of Hepatocellular Carcinoma in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) through Risk Stratification Algorithms Incorporating Ultrasound Elastography. *Cancers*. 2023 Aug 14;15(16):4097. (**ISI IF 4.5, Q1**) (Chapter 1, The current state of knowledge)
3. **Taru MG**, Tefas C, Neamti L, Minciuna I, Taru V, Maniu A, Rusu I, Petrushev B, Procopciuc LM, Leucuta DC, Procopet B, Ferri S, Lupsor-Platon M, Stefanescu H. FAST and Agile—the MASLD drift: Validation of Agile 3+, Agile 4 and FAST scores in 246 biopsy-proven NAFLD patients meeting MASLD criteria of prevalent caucasian origin. *PloS one*. 2024 May 23;19(5): e0303971. (**ISI IF 2.9, Q1**) (Personal contribution, Chapter 3)
4. Turco L\*, **Taru MG\***, Vitale G, Stefanescu H, Mirici Cappa F, Berardi S, Baldan A, Di Donato R, Pianta P, Vero V, Vizioli L, Procopciuc LM, Procopet B, Morelli MC, Piscaglia F.  $\beta$ -blockers lower first decompensation in patients with cirrhosis and enduring portal hypertension after etiological treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2024 Aug 27:S1542-3565(24)00780-8. Epub ahead of print. (**ISI IF 11.6, Q1**) (Personal contribution, Chapter 5)
  - a. \*Observation: Turco L (Internal Medicine Unit for the Treatment of Severe Organ Failure, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di, Bologna, Italy, and Taru MG (Faculty of Medicine, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania) share first authorship
5. **Taru MG**, Leucuta DC, Lupsor-Platon M, Turco L, Ferri S, Hashim A, Orasan OH, Procopet B, Stefanescu H, Morelli MC, Piscaglia F, Ravaioli F. Diagnostic accuracy of 2D-SWE ultrasound for liver fibrosis assessment in MASLD: A multi-level random effects model meta-analysis. *Hepatology*. 2024 Dec 16. Epub ahead of print. (**ISI IF 12.9, Q1**) (Personal contribution, Chapter 4)

## INTRODUCERE

Această teză de doctorat reprezintă rezultatul unui program comun de doctorat între Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, România, sub îndrumarea Prof. Dr. Lucia Maria Procopciuc, și Universitatea Alma Mater Studiorum din Bologna, Italia, sub îndrumarea Prof. Dr. Fabio Piscaglia. Tema principală a acestei teze este boala hepatică steatozică asociată disfuncției metabolice (MASLD), o afecțiune hepatică cu o prevalență și incidență în creștere în ultimii ani, devenind astăzi cea mai frecventă formă de boală hepatică.

Progresia MASLD către stadii avansate, cum ar fi fibroza hepatică avansată și ciroza, crește semnificativ riscul de apariție a complicațiilor severe. Predicția progresiei bolii prin metode non-invazive reprezintă un domeniu dinamic și de mare importanță în cercetare, cu implicații clinice semnificative pentru îngrijirea pacienților.

Astfel, o parte esențială a cercetării mele clinice s-a concentrat pe înțelegerea mai profundă a progresiei MASLD către stadii avansate prin utilizarea tehnicilor non-invazive de elastografie ultrasonografică, inclusiv elastografia tranzitorie controlată prin vibrații (VCTE) și elastografia cu unde de forfecare bidimensionale (2D-SWE), precum și prin dezvoltarea și validarea scorurilor bazate pe VCTE.

Pentru prima dată, am validat scorurile bazate pe VCTE – Agile 3+, Agile 4 și FAST – într-o cohortă de pacienți de origine caucaziană. Printr-o meta-analiză bazată pe un model de efecte aleatorii pe mai multe niveluri, am stabilit valori prag standardizate pentru 2D-SWE, utile în diferențierea stadiilor fibrozei hepatice la pacienții cu MASLD confirmată prin biopsie. Aceste valori sunt aplicabile în îngrijirea primară și în centrele medicale specializate.

În plus, am analizat beneficiile utilizării beta-blocantelor nonselective (NSBB) la pacienții cu ciroză compensată, evidențiind rolul acestora în prevenirea primului episod de decompensare. În mod remarcabil, am demonstrat că pacienții cu varice gastroesofagiene mici și șunturi porto-sistemice pot beneficia semnificativ de acest tratament. Studiul meu a arătat, de asemenea, că diabetul zaharat de tip 2 (T2DM) reprezintă un factor de risc independent pentru apariția primului episod de decompensare, indiferent de etiologia bolii.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Boala hepatică steatozică asociată cu disfuncția metabolică (MASLD), cunoscută anterior sub denumirea de boala de ficat gras non-alcoolică (NAFLD), reprezintă o provocare reală pentru sistemul de sănătate, din cauza prevalenței sale în continua și rapidă creștere. Date recente arată o creștere de la 25,5% în 2005 la 37,8% în 2016, cu 25% dintre cazuri progresând spre steatohepatită asociată disfuncției metabolice (MASH) în decurs de trei ani. MASH este responsabilă pentru 12% din transplantele hepatice din Europa și poate duce la complicații hepatice severe, inclusiv ciroză și carcinom hepatocelular.

Diagnosticată inițial prin biopsie hepatică, natura multifactorială a MASLD și limitările biopsiei au stimulat necesitatea unor metode diagnostice non-invazive. Stadiul fibrozei rămâne un predictor esențial al mortalității, subliniind importanța detectării și

monitorizării precoce. Progresele în testele non-invazive, în special elastografia cu ultrasunete, revoluționează diagnosticul, reducând dependența de biopsie și îmbunătățind strategiile de supraveghere.

Toate bolile hepatice provoacă modificări structurale care afectează proprietățile biomecanice ale parenchimului, măsurabile prin elastografie. Aceasta poate fi realizată prin tehnici bazate pe ultrasunete, cum ar fi elastografia tranzitorie controlată prin vibrații (VCTE) și elastografia cu unde de forfecare bidimensionale (2D-SWE).

Scorurile recent dezvoltate și validate pe baza VCTE, Agile 4 și Agile 3+, sunt concepute pentru a identifica ciroza (F4) și fibroza avansată ( $\geq F3$ ), respectiv, la pacienții cu MASLD, în special în clinici specializate; totuși, acestea nu au fost încă validate în populații specifice, cum ar fi cele de origine caucaziană. Scorul FibroScan-AST (FAST) a fost dezvoltat și validat în 2020 pentru identificarea non-invazivă a pacienților cu MASH care prezintă activitate semnificativă și fibroză.

Deși utilizarea 2D-SWE pentru evaluarea non-invazivă a fibrozei hepatice s-a dezvoltat exponențial în ultimii ani, încă lipsește standardizarea valorilor prag și validarea robustă a acestora.

Hipertensiunea portală semnificativă clinic (CSPH), un factor primar în apariția decompensării hepatice, este caracterizată de un gradient de presiune venoasă hepatică (HVPG) de 10 mmHg sau mai mare. O valoare HVPG  $\geq 10$  mmHg identifică pacienții cu boală hepatică cronică avansată compensată (cACLD) cu risc crescut de decompensare, aspect de o importanță majoră pentru managementul și prognosticul bolii. Observații recente sugerează că pacienții cu MASLD prezintă particularități ale HVPG. Mai mult, decompensarea în MASLD avansat poate apărea la niveluri mai scăzute ale HVPG, comparativ cu pacienții cu alte etiologii ale bolilor hepatice.

Adaptarea acestor cunoștințe pentru MASLD avansat și MASH reprezintă în prezent un domeniu activ de cercetare.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

**Studiul 1 - FAST și Agile în MASLD: Validarea scorurilor Agile 3+, Agile 4 și FAST pe o cohortă de 246 de pacienți cu NAFLD confirmată prin biopsie, respectând criteriile de diagnostic pentru MASLD, și de origine prevalentă caucaziană**

**Scop / Obiective:** Studiul a avut ca obiectiv evaluarea eficacității scorurilor Agile 3+, Agile 4 și FAST în distingerea fibrozei avansate ( $\geq F3$ ), cirozei (F4) și MASH fibrotic (MASH + NAS  $\geq 4$  + F  $\geq 2$ ) într-o cohortă de pacienți cu MASLD confirmată prin biopsie dintr-un centru medical terțiar din Cluj-Napoca, România. Obiectivele specifice au fost evaluarea performanței scorului Agile 3+ în predicția fibrozei avansate ( $\geq F3$ ), a scorului Agile 4 în predicția cirozei (F4) și a scorului FAST în identificarea MASH fibrotic, precum și determinarea dacă aceste scoruri oferă o acuratețe diagnostică superioară față de testele non-invazive existente în aceste scenarii.

**Material și metode:** O cohortă de 246 de pacienți cu MASLD din Clinica Medicală 3 din Cluj-Napoca, România, a fost urmărită retrospectiv în perioada ianuarie 2007 – iulie 2023. Performanța diagnostică a scorurilor Agile 3+, Agile 4 și FAST a fost evaluată prin curbe AUROC, iar testul DeLong a fost utilizat pentru compararea performanței diagnostice a acestor indici. Concordanța între „zonele gri” a fost examinată folosind testul McNemar, cu semnificație statistică stabilită la  $p < 0,05$ .

**Rezultate:** Dintre cei 246 de pacienți, 113 (45,9%) au fost femei, iar 75 (30,5%) prezentau diabet. Scorurile Agile 3+ și Agile 4 au demonstrat o performanță excelentă în identificarea fibrozei avansate ( $\geq F3$ ) și a cirozei (F4), obținând AUROC-uri de 0.909 și, respectiv, 0.968, în timp ce scorul FAST a oferit rezultate acceptabile în distingerea MASH fibrotic. Comparativ cu FIB-4 și LSM-VCTE, scorurile Agile 3+ și Agile 4 au avut o performanță superioară față de FIB-4 și o performanță similară cu LSM-VCTE, dar cu o acuratețe diagnostică mai mare, reducând astfel zona gri.

**Concluzii:** Agile 3+ și Agile 4 sunt scoruri fiabile și non-invazive pentru identificarea fibrozei avansate sau a cirozei la pacienții cu MASLD, în timp ce scorul FAST a demonstrat o performanță moderată în identificarea MASH fibrotic.

## **Studiul 2 - Acuratețea diagnostică a elastografiei cu unde de forfecare bidimensionale (2D-SWE) pentru evaluarea fibrozei hepatice în boala hepatică steatozică asociată cu disfuncția metabolică (MASLD): O meta-analiză cu model de efecte aleatorii pe mai multe niveluri**

**Scop / Obiective:** Scopul acestui studiu a fost realizarea unei analize sistematice și a unei meta-analize folosind un model cu efecte aleatorii pe mai multe niveluri pentru a evalua acuratețea diagnostică a tehnicii 2D-SWE la pacienții cu MASLD confirmată prin biopsie. Ne-am propus să stabilim valori prag fiabile pentru identificarea diferitelor stadii de fibroză hepatică, aceste valori putând fi în viitor aplicate eficient în practica clinică.

**Material și metode:** Acuratețea diagnostică a tehnicii 2D-SWE a fost evaluată pentru diferite stadii de fibroză hepatică la pacienții cu MASLD. Analiza pe subgrupuri a luat în considerare producătorul echipamentului ultrasonografic, caracteristicile demografice ale pacienților și comorbiditățile prezente. Un model bivariant logit-normal cu efecte randomizate a fost utilizat pentru a estima sensibilitatea, specificitatea și AUROC agregate. Un model cu praguri multiple a facilitat analiza studiilor care au raportat mai multe valori prag, permițând totodată calculul valorilor predictive pozitive și negative pentru diferite probabilități pre-test.

**Rezultate:** Douăzeci de studii observaționale (SuperSonic Imagine, General Electric Healthcare, Canon Medical Systems) au îndeplinit criteriile de includere, cuprinzând 2223 de pacienți cu MASLD confirmată prin biopsie. Prevalența fibrozei ușoare (F1), fibrozei semnificative (F2), fibrozei avansate (F3) și cirozei (F4) a fost de 30,0%, 18,5%, 17,9% și, respectiv, 10,9%. Valorile sAUC [95% CI] pentru detectarea  $\geq F1$ ,  $\geq F2$ ,  $\geq F3$  și F4 au fost de 0.82 [0.16-0.98], 0.82 [0.76-0.88], 0.86 [0.77-0.93] și 0.89 [0.80-0.95], respectiv. Valorile prag optime au fost de 6.432 kPa pentru  $\geq F1$ , 8.174 kPa pentru  $\geq F2$ , 9.418 kPa pentru  $\geq F3$  și 11.548 kPa pentru F4.

**Concluzii:** Meta-analiza a identificat valori prag optimizate pentru stadializarea fibrozei hepatice prin 2D-SWE la pacienții cu MASLD, evidențiind o performanță diagnostică excelentă și subliniind potențialul standardizării acestor valori prag.



### **Studiul 3 - Eficacitatea blocantelor $\beta$ nonselective în prevenirea primului episod de decompensare la pacienții cu ciroză compensată și hipertensiune portală semnificativă clinic (CSPH) după tratamentul etiologic. Diabetul zaharat ca și factor de risc independent pentru primul episod de decompensare**

**Scop / Obiective:** Studiul a avut ca obiectiv evaluarea impactului beta-blocantelor nonselective (NSBB) asupra apariției primului episod de decompensare la pacienții cu ciroză și dovezi clinice de hipertensiune portală semnificativă clinic persistentă (CSPH) la doi ani după tratamentul etiologic. Ne-am propus să identificăm factorii de risc independenți care contribuie la apariția primului episod de decompensare în diferite etiologii, inclusiv MASLD, oferind astfel o înțelegere mai clară a progresiei bolii și a posibilelor puncte de intervenție.

**Material și metode:** O cohortă de 406 pacienți cu ciroză hepatică compensată de la Policlinica Sant'Orsola din Bologna, Italia, a fost urmărită retrospectiv în perioada 2017-2020. Analizele de regresie Cox multivariable au fost realizate pentru a identifica predictorii decompensării, cu raportarea ratelor de risc și intervalelor de confidență de 95%. Analiza curbei ROC a fost utilizată pentru a evalua performanța parametrilor continui, cu semnificație statistică stabilită la  $p < 0,05$ . Analiza statistică a fost realizată utilizând IBM SPSS (versiunea 29) și software-ul R.

**Rezultate:** În urma unei perioade de urmărire în medie de 32 de luni, 127 (31%) dintre pacienți au experimentat primul episod de decompensare, tipul de decompensare cel mai frecvent fiind ascita (77%). Ratele de decompensare au fost mai scăzute la pacienții tratați cu NSBB-uri (16% vs 44%;  $P < 0,0001$ ). În analiza de regresie Cox, hemoglobina, scorul Child-Pugh, Modelul pentru Boala Hepatică în Stadiu Final – Sodiu (MELD-Na), prezența diabetului și infecțiile bacteriene au fost predictorii independenți ai decompensării, în timp ce utilizarea NSBB-urilor a avut un efect protector (raport de risc, 0,32; interval de confidență de 95%, 0,20-0,49;  $P < 0,0001$ ).

**Concluzii:** NSBB-urile scad riscul apariției primului episod de decompensare la pacienții cu ciroză și hipertensiune portală semnificativă clinic persistentă (CSPH), chiar și după tratamentul etiologic.

## **CONCLUZII GENERALE**

În concluzie, Studiul 1 oferă o evaluare cuprinzătoare a mai multor teste de diagnostic non-invazive (NIT) în contextul bolii hepatice steatozice asociate cu disfuncția metabolică (MASLD). Validarea scorurilor Agile 3+, Agile 4 și FAST în distingerea diferitelor stadii de fibroză hepatică la pacienții caucazieni cu MASLD confirmată prin biopsie subliniază utilitatea lor potențială în practica clinică, în special în îmbunătățirea acurateții diagnostice și reducerea rezultatelor indeterminate. În plus, Studiul 2 susține aplicabilitatea largă a elastografiei cu unde de forfecare bidimensionale (2D-SWE) pentru evaluarea diferitelor stadii de fibroză hepatică în MASLD confirmată prin biopsie, subliniind necesitatea unei analize atente a factorilor individuali ai pacienților și a

variațiilor de performanță ale echipamentelor pentru a asigura evaluări precise. Rezultatele prezentate în Studiul 3 subliniază semnificația clinică a utilizării beta-blocantelor nonselective (NSBB) în prevenirea episoadelor de decompensare la pacienții cu ciroză compensată, inclusiv la cei cu ciroză asociată MASLD și hipertensiune portală semnificativă clinic persistentă (CSPH). Studiul 3 subliniază, de asemenea, semnificația factorilor incluși în noua definiție a MASLD, cum ar fi diabetul zaharat de tip 2, și impactul acestora asupra progresiei bolii și riscului de decompensare, indiferent de etiologie. Interacțiunea dintre NSBB și factorii declanșatori ai decompensării, precum prezența diabetului zaharat de tip 2, sau infecțiile bacteriene, sugerează beneficii potențiale care depășesc efectele lor hemodinamice primare.

## **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE**

**Validarea scorurilor diagnostice:** Această cercetare a fost prima care a validat scorurile Agile 3+, Agile 4 și FAST pentru identificarea a diferite stadii de fibroză hepatică la pacienții cu MASLD confirmată prin biopsie de origine caucaziană. Studiul a confirmat și stabilit noi valori prag, reducând semnificativ „zona gri” comparativ cu valorile prag standard ale LSM-VCTE.

**Meta-Analiză pentru 2D-SWE:** O meta-analiză folosind un model de efecte aleatorii pe mai multe nivele pentru 2D-SWE în MASLD confirmată prin biopsie (2.223 subiecți) a demonstrat o acuratețe diagnostică excelentă și a stabilit valori prag standardizate pentru diferite stadii de fibroză hepatică.

**Impactul tratamentului cu beta-blocante non-selective (NSBB):** NSBB reduc semnificativ riscul apariției primului episod de decompensare la pacienții cu ciroză compensată cu CSPH, chiar și după 2 ani de la efectuarea tratamentului etiologic, inclusiv în cazurile de MASLD. Pacienții tratați cu NSBB au avut o rată de decompensare mai mică (16%) comparativ cu cei care nu utilizau NSBB (44%). Diabetul zaharat de tip 2 a fost identificat ca predictor independent al progresiei bolii hepatice și al decompensării, acesteia.