

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ  
УМБАЛ „СВ. ИВАН РИЛСКИ“  
КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ

Д-Р ИВАН ЦВЕТАНОВ ВЪЛКОВ

**СЕРУМНИ ЛИПИДИ ПРИ ХРОНИЧЕН ХЕПАТИТ С И ВРЪЗКАТА ИМ С  
ХАРАКТЕРА И ЕВОЛЮЦИЯТА НА БОЛЕСТТА**

Дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност – Гастроентерология – 7.1

Научен ръководител  
Проф. д-р Красимир Антонов Антонов, дмн

София, 2018 г.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения .....	3 стр.
Въведение.....	6 стр.
Литературен обзор.....	8 стр.
Цел и задачи.....	32 стр.
Материали и методи.....	33 стр.
Резултати .....	51 стр.
Обсъждане.....	92 стр.
Изводи.....	102 стр.
Научни приноси.....	104 стр.
Литература.....	107 стр.
Публикации и научни съобщения.....	121 стр.
Признателност .....	123 стр.

## I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

АЛТ – аланин аминотрансфераза  
Апо-В – аполипопротеин В  
Апо-Е – аполипопротеин Е  
АСТ – аспартат аминотрансфераза  
ГГТ – гама-глутамилтрансфераза  
ГРГ – горна референтна граница  
ЗДТ2 – захарен диабет тип 2  
ИР – инсулинова резистентност  
ИТМ – индекс на телесна маса  
ЛВЧ – липовирочастици  
ММФС – моноцитно-макрофагеална система  
МС – метаболитен синдром  
НАС – неалкохолна стеатоза  
НАСБ – неалкохолна стеатозна болест  
НАСХ – неалкохолен стеатозен хепатит  
НК – нуклеокапсид  
НС – несигнификантен  
НГН – нарушена гликемия на гладно  
НГТ – нарушен (намален) глюкозен толеранс  
НПС – негативна предсказваща стойност  
ОГТТ – орален глюкозотолерансен тест  
ППС – позитивна предсказваща стойност  
СЗО – Световна здравна организация  
СО – стандартно отклонение  
ТВО – траен вирусологичен отговор  
ХХС – хроничен хепатит С  
ХЦК – хепатоцелуларен карцином

На латиница:

AUROC – площ под ROC крива

Anti-HBc total – имуноглобулини клас G и/или M срещу сърцевинния антиген на вируса на хепатит B

CRP – C реактивен протеин

CCL2 – хемокин (C-C) лиганд тип 2, моноцитен хемоатрактантен протеин -1

CCR2 – хемокин (C-C) рецептор тип 2

CETP – холестерил-естер трансферен протеин

ELISA – ензим-свързан имуносорбентен анализ

HBsAg – повърхностен антиген на вируса на хепатит B

HBV – хепатит B вирус

HBV ДНК- хепатит B вирусна дезоксирибонуклеинова киселина

HDV – хепатит делта вирус

HCV – хепатит C вирус

HCV Ag – (сърцевинен) антиген на хепатит C вируса

HCV РНК – хепатит C вирусна рибонуклеинова киселина

HDL – липопротеини с висока плътност

HIV – човешки имунодефицитен вирус

HOMA-IR – Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance

IDL – липопротеини с междинна плътност

IL28B – ген за интерлевкин-28B в хромозома 19 при човека

IL-8 – интерлевкин-8

IP-10 – интерферон гама-индуциран протеин 10

LDL – липопротеини с ниска плътност

LDLR – рецептор за липопротеини с ниска плътност

Lp (a) – липопротеин (a)

LS – liver stiffness, еластографска плътност на чернодробния паренхим

ln – естествен логаритъм

Ig – десетичен логаритъм

LR (+) – likelihood ratio positive, положителен коефициент на вероятност

LR (-) – likelihood ratio negative, отрицателен коефициент на вероятност

Max – максимална стойност

MELD – Model for End-Stage Liver Disease, скор за оценка на чернодробна дисфункция

(METAVIR) Meta-Analysis of Histologic Data in Viral Hepatitis - хистологична скорова система за хроничен вирусен хепатит

Min – минимална стойност

MCP-1 – моноцитен хемоатрактантен протеин – 1

MTTP – микрозомален триглицериден трансферен протеин

NK клетки – “natural killer” цитотоксични лимфоцити

N – брой

Non-HDL – сбор на липопротеините с различна от висока плътност

PGM – програма за добиване на резултати от ензим-свързания имуносорбентен анализ

PNPLA3 – ген за адипонутрин в хромозома 22 при човека

PPAR (алфа, гама) – пероксизомален-пролифератор активиран рецептор (алфа, гама)

RD5L, RD6Q, RD1-83, RD6P – наименования на реактиви използвани при ензим-свързания имуносорбентен анализ

ROC – receiver operating characteristic, работната характеристика, разграничителна способност на метод

RT real-time PCR – обратнотранскриптазна „real-time” полимеразноверижна реакция

SR-BI – „scavenger” рецептор клас B, тип I

Stat fax 2100 – наименование на четец за добиване на резултати от ензим-свързания имуносорбентен анализ

TG/LDL – съотношение на серумните триглицериди и липопротеини с ниска плътност

TNF алфа – тумор некротизиращ фактор алфа

VLDL – липопротеини с много ниска плътност

## II. ВЪВЕДЕНИЕ

Вирусът на хепатит С (HCV) е преносим по кръвен път, световно разпространен причинител на остър и хроничен хепатит при човека. Към наши дни съществуват методи за прецизна молекулярна и серологична диагностика на инфекцията. В последните пет години настъпи революция и в лекарствената терапия на хроничния хепатит С (ХХС). Съществуват ефективни терапевтични схеми за всички генотипове на инфекцията и за широкия клиничен спектър на инфектираните субпопулации и се обсъжда световно елиминиране на вирусната инфекция. Въпреки успеха в лекарствената терапия, множество въпроси за природата, имунните и метаболитни патогенетични механизми на HCV инфекцията остават неизяснени. Значимостта на проблема се определя от широкото разпространение на HCV, вирулентността на патогена, често безсимптомния ход на протичане на чернодробната болест и нарастващите данни за извънчернодробни прояви на хроничната инфекция.

При диагностициране на ХХС е необходимо да бъде определен стадия на чернодробната болест. Наличието на чернодробна фиброза, чернодробна цироза или декомпенсирана чернодробна цироза определят неговата прогноза, избора на терапия и дългосрочно проследяване. Високата успеваемост на противовирусната терапия във всички стадии на компенсирания чернодробна болест превърна чернодробната биопсия в непредпочитан в много страни метод, макар референтен стандарт за оценка на болестта. В практиката са приети лабораторни методи (сурогатни маркери и скорове), базирани на ултразвук и механични вибрации методи (еластография) за неинвазивна оценка на чернодробната фиброза, които доближават диагностичната стойност на хистологичния метод.

Натрупани са данни за взаимовръзки на инфламаторните механизми на заболяването с чернодробната стеатоза, нарушения в липидната и глюкозната обмяна, и данни за повишен кардиометаболитен риск. Към момента отделният принос на всеки един от тези фактори за дългосрочната прогноза на заболяването не е ясно определен. Рискът от декомпенсация на чернодробната болест и първичен чернодробен рак намалява след успешно лечение на вирусната инфекция, но остава съществен при наличието на напреднала септална чернодробна фиброза и чернодробна цироза. Метаболитните и токсични фактори са тези, които поддържат чернодробно увреждане след успешно елиминиране на вирусната инфекция.

Необходимо е разширяване на познанието за чернодробната стеатоза и фиброза при ХХС, които не винаги търпят обратно развитие при излекуването от вирусната инфекция. Възможно е обособяването им като отделно състояние на чернодробната болест при ХХС в отсъствие на вирусния причинител. Откриването на нови молекули и пътища на чернодробно увреждане, пренасянето на познания и подходи утвърдени при чернодробни болести с различна етиология може да е ключ към отговора на тези въпроси.

В литературния обзор са представени основни аспекти на взаимодействие между HCV инфекцията и липидната обмяна на човека - от молекулно ниво до използвани в практиката липидни показатели. Разгледани са имунорегулаторните механизми, които придават значение на метаболитните процеси и чернодробната стеатоза за хода на чернодробната болест, и за кардиометаболитни извънчернодробни прояви при ХХС. Потърсена е аналогия на процесите с тези при неалкохолната стеатозна болест и е обоснован аналитично-сравнителния подход при част от проведените проучвания съставляващи дисертационния труд.

### III. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

HCV е сред главните причинители на остро и хронично чернодробно заболяване при човека. Броят на хронично инфектирани сред световното население се изчислява на приблизително 119 милиона виремични от поне 170 милиона серологично позитивни случаи [124]. Генотип 1 на вируса се среща при 49%, генотип 3 при 18% от инфектираните, а около 33% от случаите се поделят между генотипове 2,4,5 и 6 [94]. Приблизително 85% от случаите на инфекция с HCV хронифицират. Около 50% от тях придобиват прогресиращ ход на болестта с изразено фиброобразуване в чернодробния паренхим. До 20% от хронично болните могат да достигнат стадий на чернодробна цироза за период от 5 до 20 години. Годишната заболеваемост от хепатоцелуларен карцином (ХЦК) сред HCV инфектираните пациенти с чернодробна цироза достига 2% [14, 27, 94].

В морфологичната основа на хроничното чернодробно заболяване са застъпени в различна степен възпаление, чернодробна фиброза и стеатоза. Развитието на чернодробната фиброза е сигурен показател за прогресия на чернодробното заболяване и в прогнозата на чернодробната цироза, усложненото протичане на която се свързва със значителна смъртност. HCV инфекцията е съпътствана от извънчернодробни прояви при част от хронично инфектираните: имуномедиранни - гломерулонефрит, васкулит, лимфопролиферативни заболявания; метаболитни - промени в липидната обмяна, инсулинова резистентност (ИР), дисгликемия – предиабет и захарен диабет тип 2 (ЗДТ2); съдови – свързани с предпоставки за ускоряващи атеросклеротичния процес [51, 107].

#### 1. Структурно и патофизиологично значение на вътреклетъчните липидите за HCV

HCV притежава едноверижна рибонуклеинова киселина (HCV РНК) с положителна полярност и принадлежи към род *Hepacivirus* на сем. *Flaviviridae*. Клатрин медираната ендоцитоза е основен механизъм на навлизане в клетките в тази вирусна фамилия. Етапите от жизнен цикъл на HCV са тясно свързани с липидни взаимодействия в хепатоцитите и с липопротеини в кръвотока. Асоциацията на вирусните частици с липопротеини и образуването на липовирочастици (ЛВЧ) е

определяща за инфекциозността им. ЛВЧ съдържат вариращо съотношение на триглицериди, холестерол, холестеролови естери, аполипопротеини, имуноглобулини, вирусни антигени и частици [10, 50]. Наскоро беше визуализирана с трансмисионна електронна микроскопия структурата на HCV вирусните частици и в частност ЛВЧ в проби от инфектирани пациенти. На ултраструктурно ниво се потвърди наличието на липидна обвивка около вирусния нуклеокапсид (НК), която съдържа и аполипопротеини В и Е (Апо-В и Апо-Е). НК на HCV не е ригиден и няма константна форма, както при други вируси. След остраняване на липидната обвивка с повърхностно активни реактиви се нарушава структурата на НК, което потвърждава ролята на липидите за поддържане на структурата и жизнеспособността на HCV вирусните частици. Размерът на ЛВЧ не е константен и както този на липопротеините в кръвотока, зависи от плазменото липидно съдържание. Наблюдават се и частици без нуклеокапсид и вирусна РНК, съставени единствено от липопротеини и повърхностните антигени на HCV, със структура трудно различима от обичайната за физиологичните липопротеини [127]. Не е напълно изяснено дали ЛВЧ се образуват от сливането на вирусни частици с новообразувани VLDL или приобщават аполипопротеини, холестерол и триглицериди непосредствено преди напускане на хепатоцитите [10, 50].

Свързването с мембранни рецептори за липопротеини съдейства за навлизането на вируса в хепатоцитите. Участието на семейството рецептори за липопротеини с ниска плътност (LDL), с главен представител едноименния рецептор (LDLR), е силно застъпено, както и на рецептора за липопротеини с висока плътност (HDL) „scavenger” рецептор клас В, тип I (SR-BI). Плътността на ЛВЧ, както и на липопротеините, се определя главно от съдържанието на триглицериди. В богатите на триглицериди ЛВЧ се намират сравнително повече имуноглобулини от класове М и G, които свидетелстват за антигенността на частиците, но в условията на хронична инфекция не изпълняват неутрализираща функция. Асоциирането с липидни молекули е ефективен механизъм за имунно прикриване на HCV [10].

HCV Ag и някои неструктурни вирусни протеини (NS5A), заедно с протеини от клетката гостоприемник, се организират пространствено на повърхността на липидните капчици в хепатоцитите. Репликацията на вируса се осъществява в така образуван комплекс (мрежа) от единични, двойни мембрани и везикули [99, 160]. Обособените мембранни компартименти в цитозола на хепатоцитите са пространства за вирусна

репликация, които остават скрити за вътреклетъчните механизми на имунна сигнализация и разпознаване [108].

Въздействието на вирусните протеини върху липогенните пътища е многопосочно. Известен е потискащия ефект на вирусните протеини и ИР върху експресията на микрозомалния триглицериден трансферен протеин (МТТР). В ендоплазмената мрежа МТТР е необходим за пакетирание и експорт на богати на триглицериди Апо-В съдържащи липопротеини [98]. При пациенти с ХХС се намира засилена де ново липогенеза в сравнение със здрави лица, като същевременно е подтиснат холестероловия синтез [76]. В клетъчни култури инфектирани с HCV се доказват високи нива на активацията на транскрипционни фактори регулиращи липогенезата [93]. Сред механизмите на възникване на HCV асоциираната хипохолестеролемия, освен инхибирането на Апо-В секретирания частици, се намира и нарушение в синтеза на холестерола в стъпките след образуване на междинния метаболит сквален [35].

Проучван е ефектът на HCV инфекцията върху митохондриалното бета окислението на мастни киселини. В клетъчни култури инфектирани с HCV се намират ниски нива на транскрипционни фактори свързани с бета окислението на мастни киселини. Ефектът е едновременен и с намалена способност за активиране на интерферон зависимите гени [8]. Цялостният кетоген потенциал на организма, като сурогатен маркер за интензивността на бета окислението, при пациенти с ХХС е редуциран. Общите кетонни тела при стандартни условия на гладуване в изследваната група показват по-ниски стойности при пациенти с ХХС в сравнение със здрави лица. При пациентите с ХХС с данни за ИР, оценена спрямо праг на НОМА-IR > 2.5, общите кетони се намират по-ниски отколкото при пациентите с нормална чувствителност към действието на инсулина. Изследователите намират пряка зависимост в този експеримент между количеството на сърцевинния антиген на вируса (HCV Ag) и величината на потискащия митохондриалното бета окисление ефект [131].

Взаимодействието на Апо-Е и Апо-В със структурните протеини на HCV има стеатогенен ефект. Присъствието на HCV Ag в липидните капчици забавя обменните процеси в тях. За сглобяването на новите вирусни частици се използват клетъчните механизми, които осигуряват продукцията на липопротеини с много висока плътност (VLDL). Необходимо е новообразуваните ЛВЧ да са подобни на VLDL по структура и състав, за да използват същия експортен път [24, 54].

## 2. Трансформация и транспорт на липопротеините

Ендогенните триглицериди и холестерол напускат хепатоцита в състава на VLDL. В състава на липопротеините участват два вида Апо-В – Апо-В-100 (с чернодробен произход) и Апо-В-48 (с тънкочревен произход). Ендотелната липопротеин липаза хидролизира триглицериди от VLDL и се образуват IDL. IDL запазват няколко Апо-Е, проявяващи силен афинитет към LDLR и един Апо-В-100, проявяващ по-слаб афинитет към LDLR. Чернодробната липаза отнема още триглицериди, концентрира се съдържанието на холестеролови естери и загубват Апо-Е, като така се образуват LDL съдържащи една молекула Апо-В-100. Транскрипционната регулация на LDLR се подчинява на концентрацията на свободни вътреклетъчни стероли, главно холестерол. При висока експресия на LDLR нивото на LDL в кръвта се поддържа в ниски граници с ендцитоза на повече IDL и LDL частици, а при ниска експресия - обратно. В размяната на холестеролови естери и триглицериди между HDL и липопротеини с по-ниска плътност значителна роля има холестерил-естер трансферния протеин (СЕТР) [32, 63].

Екзогенните триглицериди и холестерол се пакетират в ентероцитите като хиломикрони (първични) съдържащи Апо-В-48. Достигнали в кръвотока, хиломикроните получават аполипопротеини от HDL (зрели хиломикрони) и „обедняват“ на триглицериди (остатъчни хиломикрони, останки) под действието на липопротеин липазата. Останките от тях съдържащи Апо-Е и Апо В-48 се преработват в хепатоцитите. За разлика от Апо-Е и Апо-В-100, Апо-В-48 не проявява афинитет към LDLR. За тези аполипопротеини съществува едноименен мембранен рецептор в клетките на моноцитно-макрофагеалната система [22, 148, 159].

При HCV инфектирани пациенти се намира понижена експресия на чернодробната липаза и повишени серумни нива на СЕТР в сравнение с тези постигнали траен вирусологичен отговор (ТВО) след лечение. В резултат на двата ефекта може да се очаква повишено преразпределение на плазмените триглицериди между липопротеините с обичайно по-висока от тази на VLDL плътност (IDL, LDL, HDL), вместо хидролизата им [132, 137].

При проучване между пациенти с ХХС генотип 1 и 2, съотношението между триглицериди съдържащи се във VLDL и тези в обичайно по-плътните липопротеини, е

с по-малка стойност при стадий на напреднала фиброза и чернодробна цироза [109]. При пациенти с персистираща HCV инфекция се наблюдава относително повишено съдържание на триглицериди в липопротеините извън VLDL в сравнение с тези постигнали ТВО. При излекуваните пациенти триглицеридното съдържание преобладава във VLDL, което е характерно за физиологичното състояние. Изследователите намират по-високи нивата на общ холестерол и LDL след ТВО, както и по-високи стойности на съотношението общ холестерол/триглицериди, отколкото при хронично инфектирани пациенти с HCV генотип 1b [106, 109].

Съществуват данни, че при ХХС се умножава експресията на LDLR. Поддържането на вътреклетъчното липидно съдържание е в полза на вирусната пролиферация. Апо-Е е отговорен за инфекциозността на ЛВП като улеснява навлизането в клетките през LDLR поради силния си афинитет. Апо-В-100 е необходим при пакетирането и експорта на частиците. Умножената експресия на LDLR води до засилена ендоцитоза на Апо-Е съдържащи частици в хепатоцитите, вместо преобразуването им в кръвотока като богати на холестерол LDL. По този механизъм Апо-В-100 се използва циклично за експортиране на нови VLDL или VLDL подобни ЛВЧ, а нивата на LDL се поддържат ниски [144].

### **3. Липидни показатели при ХХС в естествена динамика и при противовирусно лечение**

В острата фаза на HCV инфекцията, за която фиброобразуването не е характерно, се отчита понижение на липидните показатели. Според различните съобщения на изследователски колективи, липидните промени при ХХС се намират в различни серумни липиди – едни намират понижени нива на общ холестерол, LDL и Апо-В, а други – понижени HDL и триглицериди, като ги свързват с наличието на напреднала фиброза. При проследяване, след спонтанно ограничаване на инфекцията или след постигане на ТВО, се наблюдава нарастване на липидните нива и нормализиране на съотношенията между тях [36, 123, 128].

При терапия със съвременните директно действащи антивирусни средства липидните промени при пациенти с ХХС след лечение показват междугенотипни различия. При пациенти с ХХС генотип 1, след ТВО нарастват нивата на общ холестерол, LDL, HDL и намаляват тези на триглицеридите. При инфектираните с генотип 3 нарастват на същите показатели, но нивата на общ холестерол нарастват

значително повече в сравнение с тези при генотип 1, а промяна в триглицеридните нива не се наблюдава. При пациентите с ХХС генотип 2 в същата проучвана група не се наблюдават промени в липидните показатели преди и след лечение. Описаните в проучването промени не показват зависимост от наличието на чернодробна цироза в никоя от изследваните според генотипа групи [119]. Съобщава се за обратими нарушения на холестероловия синтез, които засягат постскваленовите стъпки в пътя на синтеза. Обратима е и хипохолестеролемията при ХХС генотип 3. Наблюдаваните предшествващи холестерола метаболити, а също общия холестерол, Апо-В и LDL се намират по-ниски при стадий на чернодробна цироза. При лечение на пациентите с ХХС генотип 2 и 3 с директнодействащи противовирусни медикаменти се отчита нарастване и нормализиране на холестероловия синтез, и метаболизъм след постигането на ТВО. По-ниските нива на холестерола и предшествващите го метаболити се задържат при неотговорилите на противовирусна терапия [35, 169].

Предсказващата стойност на общия холестерол за терапевтичен отговор при лечение с пегилиран интерферон алфа и рибавирин е дискуссионна. Пациентите постигнали ТВО показват нарастване на нивата на общ холестерол и LDL, докато при неотговорилите на терапия тези показатели се задържат ниски. Изходните им стойности обаче не показват връзка с постигането на ТВО [37]. Намират се и данни, които свързват високите изходни стойности на общия холестерол и LDL с повече случай на ТВО [52]. Проучване на полиморфизми в хромозома 19 при човека, в съседство на гена за интерлевкин-В28 (IL28В) при пациенти с ХХС генотип 1 установява, че нивото на LDL има значение при хетерозиготния вариант за предсказване на терапевтичния отговор при лечение с пегилиран интерферон и рибавирин. LDL над 130 mg/dl предсказва 80% ТВО за хетерозиготни пациенти с вирусен товар под 600 000 IU/ml. Когато при пациентите е налице един от двата хомозиготни варианта, прогнозата за отговора на терапия се определя от генетичния фактор [34].

При пациенти с ХХС генотип 1 се намира възходяща градация в стойностите на Homeostatic model assessment - insulin resistance (НОМА-IR) и триглицеридите, нарастващи от ХХС към ХХС със стеатоза, и ХХС с белези на неалкохолен стеатохепатит (НАСХ). В същата градация се нараства и честотата на напреднала чернодробната фиброза в проучените групи [20]. Публикуваните резултати посочват сравнително по-ниски нива на общ холестерол, HDL, LDL при ХХС генотип 3 в сравнение със здрави лица и хронично инфектирани с друг генотип на вируса пациенти. При генотип 3 промените се отдават на натрупването на значително количество липиди

като чернодробна стеатоза, която количествено корелира с вирусния товар в изследваната група [138]. Директна асоциация между вирусния товар и различни липидни показатели съществува в научните съобщения, но липсва еднозначност в съобщаваните резултати за конкретен липиден показател. При пациенти с ХХС различен от генотип 1 се съобщава за обратна корелация на вирусния товар със серумното ниво на Апо-В [123]. При групи от инфектирани с генотип 1 пациенти се намира асоциация с нивото на серумни триглицериди в едно проучване и с плазмените нива на триглицериди, и с нивата на LDL при друго [128, 157]. При сравнително проучване между ХХС генотип 1 и 2 се намира корелация на вирусния товар с нивата на общ холестерол единствено при генотип 2 [37].

#### **4. Липидни показатели и оценка на чернодробната фиброза**

Стадият на чернодробната фиброза при пациенти с ХХС е от ключово значение за избора на лечение и режим на проследяване. Хистологичният метод за оценка на тежестта на чернодробното увреждане, стадиран съобразно скоровата система METAVIR се приема за референтен стандарт. Не е удовлетворена до момента необходимостта от алтернативен на чернодробната биопсия неинвазивен метод, който да се характеризира с висока диагностична стойност, възпроизводимост и ниска себестойност. Сред утвърдените неинвазивни методи за оценка на чернодробната фиброза водещо значение имат транзиторната еластография и лабораторните скорове [43]. Независимо от статута си на референтен стандарт, чернодробната биопсия е метод, при който може да се очакват грешки свързани с представителността на хистологичната проба и вариабилна интерпретацията на хистологичния резултат [135].

Честотата на чернодробната цироза сред хронично инфектираните с HCV е подценена. Безсимптомното или неспецифично протичане на заболяването води до голям брой на незапознати със състоянието си инфектирани лица. Диагнозата на инфекцията, включително в развитите страни, често съвпада с тази на напреднало хронично чернодробно заболяване. Доказано нараства успеваемостта в диагностициране на напредналата чернодробна болест, когато бъдат включени и неинвазивни методи в търсенето на напреднала чернодробна фиброза и чернодробна цироза [53, 100].

Транзиторната еластография е неинвазивен метод за оценка на плътността на биологична тъкан. Числовият израз на модула на еластичност се нарича liver

stiffness – плътност, нееластичност, ригидност на чернодробния паренхим [103]. Възможни са несъответствия между еластографската и хистологичната оценка на фиброзата с разлика от 2 или повече стадия по литературни данни. Несъответствието достига до 1 на 7 случая и се свързва с грешки или невалидност на измерванията, повишена хистологична и биохимична активност на болестта, затлъстяване, както и с грешки в хистологичното изследване [104]. Несъответствия често се намират и при напреднала чернодробна фиброза и при възпаление с висока активност [72, 84]. Фактори, които повлияват измерването и интерпретацията на резултатите са: затлъстяване, остро чернодробно увреждане, екстрахепатална холестаза, висока биохимична активност, чернодробен венозен застои [13, 31, 95, 96].

Интерес представляват значението и използваемостта на липидните показатели в оценката на чернодробното увреждане при ХХС предвид и на влиянието на вирусната инфекция върху липидната обмяна. При метаболитна характеристика на пациенти с хронична HCV инфекция се посочват ниски нива на холин, ацетоацетат и LDL при чернодробна цироза в сравнение с липсата на чернодробна фиброза. Създаден от тези метаболити модел позволява разграничаването на тези две състояния. Намират се също по-високи нива на VLDL и по-ниски на HDL при пациенти с чернодробна цироза в сравнение с тези без чернодробна фиброза [44].

Наложени в практиката са два неинвазивни фиброзни скоря, които отчитат понижените стойности на серумния общ холестерол при напредване на чернодробната фиброза при ХХС. Forns индекс, формулата на който включва тромбоцитен брой, възраст, гама-глутамилтрансферазна активност (ГГТ) и общ холестерол, е валидиран за изключване на сигнификантна фиброза [48]. Индексът се изчислява по регресионната формула:

$$\begin{aligned} \text{Forns индекс} &= 7.811 - 3.131 \ln [\text{тромбоцитен брой (} 10^9/\text{L)}] \\ &+ 0.781 \ln [\text{ГГТ (IU/L)}] + 3.467 \ln [\text{възраст (години)}] \\ &- 0.014 [\text{общ холестерол (mg/dL)}] \end{aligned}$$

Forns индекс е проучван и за напреднала фиброза и чернодробна цироза, като диагностичната му стойност е сравнима с валидираните FIB-4 и APRI скорове [77]. Друг модел, който постига добра диагностична стойност за сигнификантна фиброза, е Fibrosis probability index (FPI) - регресионен модел базиран на възраст, наличие на

алкохолна консумация, аспартат аминотрансферазна активност (АСТ), НОМА-IR и общ холестерол [142].

FIB-4 скор и APRI скор са сред най-използваните индиректни неинвазивни лабораторни методи за оценка на чернодробната фиброза при ХХС. Освен широката си валидация в множество проучвания, тяхно предимство е достъпността на измерванията и изчислението им [61]. В част от литературните данни се посочва предимство на единия или другия скор. В директно сравнение диагностичната стойност на APRI и FIB-4 скоровете е идентична за чернодробна цироза оценена съобразно стойностите на площта под ROC кривата им (AUROC) [33]. APRI скор може да бъде използван за разграничаването на чернодробна цироза при стойности > 2, като трябва да се има предвид неоптималната чувствителност на скората при тези нива, при които може да бъде използван с висока специфичност [78]. За FIB-4 в проучванията се намира добра предсказваща стойност за стадий на фиброза F<sub>≥3</sub> при стойности > 3.25, докато АСТ/АЛТ съотношението при стойности > 1 се представя незадоволително при търсене на F<sub>≥3</sub> и F4 стадии на чернодробна фиброза във всички проучвания [6, 77, 90, 156]. FIB-4 и APRI скор се калкулират по съответните формули:

$$FIB - 4 = \frac{\text{възраст (години)} \times АСТ (IU/L)}{\text{тромбоцитен брой } (10^9/L) \times \sqrt{АЛТ (IU/L)}}$$

$$APRI = \frac{\frac{АСТ (IU/L)}{АСТ ГРГ (IU/L)} \times 100}{\text{тромбоцитен брой } (10^9/L)}$$

Независимо от етиологичният фактор, при декомпенсирана чернодробна цироза серумните нива на всички липидни показатели се намират ниски, което се обяснява с едновременно цялостно нарушен чернодробен синтез и преобладаване на катаболитни процеси в организма. Съществува обратна корелация между нивата на липидите и степента на чернодробна дисфункция оценена с прогностичните скорове Child-Pugh и MELD. Ниските нива на общ холестерол, независимо от други прогностични фактори, предсказват повишена смъртност при декомпенсирана чернодробна цироза [19, 69].

## **5. Имуни и метаболитни механизми на чернодробното увреждане при ХХС и НАСБ**

В условията на остра HCV инфекция се отключва отговор от вродения клетъчен имунитет, последван от механизмите на придобития. Вирусните антигени могат да бъдат представени като епитопи на повърхността на специализираните антиген представящи клетки (дендритни клетки, макрофаги) с участието на главния комплекс на тъканна съвместимост клас II, или в хепатоцитната клетъчна мембрана с участието на главния комплекс на тъканна съвместимост клас I и така да бъдат разпознати от цитотоксичните Т-лимфоцити. Natural killer (NK)-клетките самостоятелно разпознават инфектираните клетки и се включват в имунната атака. Отделят се интерферони от тип I. Имуномедираната лиза на инфектирани клетки освобождава сигнали за клетъчна смърт и антигени, които привличат активирани имуноцити, и подхранват възпалителната активност. При силна и ефективна реакция на клетъчния имунитет, насочена срещу множество вирусни епитопи, настъпва ограничаване на острата инфекция. При хронифициране на инфекцията и възпалението се наблюдава спад в ефективността на клетъчните имунни механизми и силата на възпалителния отговор [156]. Персистиращата в по-ниска степен възпалителна активност при ХХС е израз на разпознаването на антигените на HCV и имунна атака, която цели да ограничи патогена, но не е достатъчна за елиминирането му. В персистиращата имунна атака се реализира хроничната чернодробна болест [18, 45].

Хроничното възпаление и свързаните с него сигнални молекули водят до трансформация на звездовидните (перисинусоидални, стелатни) клетки в миофибробласти и активацията им в посока на експанзия на екстрацелуларното пространство - образуване на патологично количество екстрацелуларен матрикс и съединителна тъкан (активна фиброгенеза). По пътя на трансдиференциация и активация, във фиброгенезата се включват миофибробласти произхождащи от портални фибробласти и мезенхимно трансформирани епителиоцити. Активността на фиброобразуващите клетки се регулира от цитокини, хемокини, хормони и растежни фактори. Активираните миофибробласти секретират сигнални молекули и експресират рецептори за тях, което предполага автокринното поддържане на провъзпалителната и профибротична среда [45, 163].

Моноцитния хемоатрактантен протеин-1 (MCP-1) е провъзпалителен и профибротичен хемокин. Известен е и с наименованието си като хемокинов С-С лиганд тип 2 (CCL2) – лиганд на едноименния рецептор CCR2. Моноцити, Т-хелперни клетки и дендритни клетки експресират рецептора. Свойствата на хемокина като хемоатрактант и адхезионен фактор определят биологичното му действие. Миграцията на притежаващите рецептора клетки е зависима от концентрационния градиент на MCP-1. Повишената плазмена концентрация води до мобилизирането на активирани моноцити от костния мозък, а повишената му тъканна концентрация води до струпването им като активирани макрофаги в зоната на увреждане. Освободеният от тях тумор некротизиращ фактор алфа (TNF алфа) отключва сигнални пътища водещи до апоптоза. Повишава се концентрацията на цитокини (интерлевкин 1-бета), което мобилизира неутрофилни левкоцити в зоната на възпаление и увеличава размерите на хепатоцитна некроза [59, 89].

Характерният възпалителен инфилтрат при ХХС е представен от лимфоцити и моноцити. Подвидове клетки на моноцитно-макрофагеалната система (ММФС) промотират острата и хронична фаза на възпаление, участват в резолюцията на възпалението, поддържат фиброгенезата или фибролизата според изхода от възпалението при инфекция с HCV. Освен в имунните процеси, Купферовите клетки участват и обмяната на липопротеини като от тях произхожда преобладаващата част от плазмения СЕТР (необходим за функциите и състава на HDL и VLDL) [73, 162].

ММФС в черния дроб е представена от моноцити, Купферови клетки (постоянни чернодробни макрофаги) и мигриращите дендритни клетки. Макрофагите участват в поддържането на физиологичния имунен толеранс в черния дроб. Чувствителни са на сигнали за тъканен стрес и клетъчно увреждане, като при тези условията се включват в провъзпалителните пътища. Купферовите клетки и увредените хепатоцити секретират MCP-1 и експресират CCR2 [58].

Звездовидните клетки в черния дроб участват в пътищата на чернодробното възпаление и фиброгенеза с отделянето на оксидативни метаболити, провъзпалителни цитокини, хемокини и растежни фактори, могат да извършват антиген-представяща функция и да фагоцитират апоптотични клетъчни елементи. MCP-1 сигнализира активираните Купферови клетки, моноцити/макрофаги и лимфоцити в зоната на увреждане. Каскадното секретирание на множество хемоатрактантни молекули създава висока концентрацията на сигнални молекули и активирани клетки, които взаимно (автокринно) се поддържат. Възпалителният процес има предназначението да ограничи

патогена и да даде начало на регенераторен процес, но персистирането му е свързано с активиране на фиброгенезата. За обратното развитие на чернодробната фиброза е необходимо ”приспиване” на миофибробластите. Процесът е имунорегулиран и се води от ресторативна субпопулация макрофаги, които навлизат в зоната на увреждане след стихване на увреждащите фактори. Протича фагоцитоза на апоптотични и увредени клетъчни елементи, и останки от тях. Част от инактивираните миофибробласти и такива експресиращи сигнали на „клетъчна старост” стават мишена на NK-клетки. [59, 120, 121]

Фиброгенезата и фибролизата са динамични процеси, които се случват едновременно. Продължителното действие на увреждащия фактор нарушава динамичното равновесие и определя преимущество на фиброгенезата. Част от макрофагеалната популация в черния дроб придобива „алтернативна поляризация” в посока фагоцитоза на апоптотични и некротични клетъчни елементи. Така те осъществяват ресторативно (анти-инфламаторно и фибролитично) въздействие върху чернодробния паренхим. Създава се възможност да започне регенераторен процес и обратно развитие на фиброзата след преодоляване на увреждащия фактор. Освен с активното образуване на екстрацелуларен матрикс и разрастването на съединителната тъкан, миофибробластите забавят фибролизата, като образуват и фактори подтискащи действието на матриксните металопротеинази. Последните са протеолитични ензими с фибролитична функция експресирани от разнообразни клетъчни елементи – Купферови клетки, други макрофаги, хепатоцити, звездовидни клетки. Макрофагите са основен източник на матриксни металопротеинзи (колагенази, еластаза - способна да разгражда напреднали фиброзни лезии в черния дроб). При инактивиране на макрофагите, в експериментални модели на чернодробно увреждане, се прекъсва процеса на фибролиза и ремоделиране на увредената чернодробна структура. Все още не е напълно характеризирани фенотипа на ресторативната макрофагеална субпопулация [64, 120, 121, 139, 145]. Множество цитокини и хемокини при пациенти с ХХС генотип 1 показват различни плазмени нива в началните стадии на фиброза и при чернодробна цироза. Сред тях са MCP-1, TNF алфа, интерлевкин-8 (IL-8) и интерферон гама-индуциран протеин 10 (IP-10). Разликата между концентрациите им в двата стадия на чернодробно увреждане е значителна и позволява обсъждането им като маркери за оценка на чернодробната фиброза [9].

При пациенти с ХХС и затлъстяване в сравнение с тези с нормално тегло се намира повишена чернодробната експресия на MCP-1 [114]. Присъствието на

неструктурните NS3/4A вирусни протеини в хепатоцитите води до по-високи тъканни нива на MCP-1 и TNF алфа в черния дроб. Неструктурните NS5A вирусни протеини повлияват положително експресията на MCP-1 в клетъчни култури. Предизвикания от вирусните протеини MCP-1 медиран хемотаксис на макрофаги в черния дроб води и до повишени нива на TNF алфа [26, 140]. Също в клетъчни култури се демонстрира, че освен с проинфламаторното си действие, TNF алфа улеснява и навлизането на HCV частиците в хепатоцитите. Основен източник на TNF алфа са активираните Купферови клетки и други макрофаги привлечени в зоната на възпаление [47].

Клетъчният имунен отговор във фазата на остър хепатит С е по-бавен при част от пациентите. Същевременно задържането на високите нива на провъзпалителните MCP-1, IL-8 и IP-10 при тези пациенти при преминаване на острия хепатит във фаза на хроничен хепатит С, се свързва с бърза прогресия към чернодробна цироза. Най-значимо от изброените за прогресиращо чернодробно увреждане е персистирането на високи нива на MCP-1 [46]. Постоянното имунно активиране в отговор на вирусните антигени е характерно за хронична HCV инфекция, но то е неефективно срещу патогена и „изтощително“ за имунния отговор [56].

Нивата на ендотелни адхезионни молекули и хиалуронова киселина при ХХС корелират с тежестта на чернодробна фиброза [117]. По време на противовирусна терапия и след успешна терапия с директно действащи противовирусни медикаменти се наблюдава спад в нивата на проинфламаторните хемокини и цитокини, но нивата им не достигат тези при здрави лица. Един от хемокините, които задържат концентрациите си след терапия е MCP-1. Предполага се, че ефектът на HCV върху имунните процеси продължава и след излекуване на вирусната инфекция [29, 57].

## **6. Предпоставки за ендотелна дисфункция при ХХС и неалкохолна стеатозна болест (НАСБ)**

НАСБ и метаболитният синдром се характеризират с повишени плазмени концентрации на MCP-1, TNF алфа, проинфламаторни интерлевкини, проинфламаторни съотношения между тях и активация на макрофагеалната и Т-хелпер лимфоцитната популации. Нивата на проинфламаторна имунна активация корелират с тежестта на чернодробно увреждане при НАСХ и са с по-ниска степен при неалкохолна

стеатоза (НАС) [55, 161]. Литературните данни подкрепят патогенетичната роля на MCP-1 за прогресия на НАС към НАСХ [55].

Предвид връзката между НАСБ и атеросклеротичния процес, и участието на моноцитно-макрофагеалната система в него, ролята на хемокина за атеросклерозата не е изненадваща. MCP-1 участва в привличането, прикрепянето и миграцията на моноцитите в субендотелното пространство. Активираният моноцити/макрофаги атакуват и фагоцитират преимуществено оксидирани липидни частици. След като попаднат в субендотелното пространство, те пренасят там и провъзпалителния си товар. Така превръщането им в „пенести клетки“ подхранва ендотелната дисфункция и прогресията към атеросклероза [60].

В условията на постпрандиална хипертриглицеридемия, дължаща се предимно на хиломикрони, при експерименти с моноцитни клетъчни линии и в периферна кръв при здрави лица, се наблюдава натрупване на липидни капчици в моноцитите. Едновременно е налице и повишена експресия на рецептори за Апо В-48 в моноцитите. Допуска се, че могат да се образуват „пенести клетки“ в кръвотока преди контакта с ендотела, които по този път да допринасят за атеросклеротичния процес въз основа на хипертриглицеридемията [22, 159].

Затлъстяването и ЗДТ2 се свързват с високи плазмени стойности на MCP-1 и повишената му експресия в ендотелни клетки, адипоцити, моноцити, макрофаги и други клетки [115]. Трайно повишената концентрация на MCP-1 в кръвотока води до инфилтрация на мастната тъкан от макрофаги и развитие на ИП при проучване върху мишки [147]. Известна е корелацията на концентрацията на MCP-1 със стойностите на ИТМ. При пациенти със затлъстяване повишената концентрация на хемокина се свързва с повишена честота на сърдечно-съдови заболявания [110].

Експресията на MCP-1 в ендотелните клетки зависи и нивата на LDL, но и от характерни промени в тази група липопротеини при пациенти с ЗДТ2. Частиците с отрицателен електричен заряд (оксидирани и гликоксидирани LDL) повишават експресията на MCP-1 и оксидативния стрес в артериалната стена в сравнение с положително заредените LDL [152]. Моноцитите и макрофагите, които имат досег с така променените LDL също проявяват увеличена експресия на CCR2 и по-интензивен MCP-1 зависим хемотаксис [66]. Високите стойности на гликемия повишават експресията на адхезионни молекули, включително на MCP-1, в ендотелните клетки. Хипергликемията води също и до възпалително активиране и пролиферация на гладкомускулни клетки в съдовата стена и повишена експресия на MCP-1 в тях [115].

Липопротеин (а) [Lp (a)] се синтезира в хепатоцитите. Частицата се състои от една молекула ниско-плътностен Апо-В съдържащ липопротеин подобен на LDL и специфичния аполипопротеин аро (а), които се свързва с Апо-В чрез единична дисулфидна връзка. Нивата на Lp(a) са генетично предопределени почти независими от възрастта и пола, а високите нива на Lp(a) се асоциират с повишен риск от сърдечно съдови заболявания. При около 30% от човешката популация могат да се измерят стойности на Lp(a) над 30 mg/dl. Това е стойността, над която рискът произхождащ от тези липопротеини е висок и нараства линейно с нарастване на стойностите им [68, 75, 153].

Оксидираните LDL могат да се свързват с MCP-1. Lp(a) пренасят оксидирани фосфолипиди и също свързват, и пренасят MCP-1. Докато оксидираните LDL са ограничени предимно в артериалната съдовата стена, Lp(a) свързан с MCP-1 циркулира в кръвотока. Свързан с оксидираните липопротеини, хемокина запазва хемоатрактантаната си функция. При преминаване субендотелно, свързаните с MCP-1 оксидирани липиди са способни да мобилизират повече клетъчни елементи, което засилва ендотелната дисфункция и прогресията на атеросклеротичната плака [166].

HCV частици способни на репликация могат да бъдат изолирани от мононуклеарни клетки в периферната кръв като се наблюдават малки генетични различия между тях и изолирана от чернодробен паренхим или серум HCV РНК. Публикуван е случай на изолирана HCV РНК от атеросклеротични плаки, което демонстрира присъствието на патогена в морфологичната основа на атеросклерозата и подкрепя хипотезата за пряко атерогенно действие на HCV [130].

## **7. Серумни липидни показатели и сърдечно-съдов риск при ХХС**

Сърдечно-съдовия риск е повишен при пациентите с ХХС и атеросклерозата може да прогресира при ниски липидни нива. При сравнение между група пациенти с хистологично верифициран ХХС и здрави лица, пациентите с ХХС показват по-висока оценка на сърдечно-съдовия риск по системата на Framingham, равняваща се на 1.5 пъти по-висока 10 годишна вероятност за развитие на хронично сърдечно заболяване. По-високи са и концентрациите на TNF алфа и IL-6 в сравнение със здравите контроли. [113].

Левокамерната хипертрофия е независим предсказващ фактор на сърдечно-съдови инциденти и характерно органно увреждане свързано с артериалната

хипертония. При пациенти с ХХС без артериална хипертония се намира по-голям обем на левокамерните измервания, отнесен към телесната маса, в сравнение с нормотензивна контролна група. При HCV инфектираните в това проучване се намират по-високи стойности на серумните триглицериди, кратинин, инсулин и НОМА-IR. Групата с ХХС без артериална хипертония показва сходни левокамерни измервания с тези при хипертензивните неинфектирани лица. Определящо значение за левокамерния обем във всички групи има наличието на ИР оценена по НОМА-IR [51, 122].

Редица проучвания при HCV инфектирани пациенти демонстрират, както повишена честота и тежест на субклинична атеросклероза, така и повишена честота на сърдечно- и мозъчно-съдови инциденти, и смъртност свързана с тях. Определящи фактори за задебеляване на каротидната интима-медия са наличието на чернодробна стеатоза, артериална хипертония, ЗДТ, тютюнопушене, нивата на С-реактивен протеин (CRP), фибриноген, вирусен товар и триглицериди, но не и нивата на холестерол [5, 51, 125]. Тежестта на атеросклеротичния процес показва връзка и със степента на чернодробна фиброза. При пациенти с ХХС генотип 1 и напреднала фиброза по-често се измерва задебеляване на каротидната интима-медия, отколкото при неинфектирани лица при еднакъв профил на традиционни сърдечно-съдови рискови фактори (чернодробна стеатоза, артериална хипертония, ЗДТ, тютюнопушене, CRP, фибриноген, триглицериди, холестерол) [126]. Дебелината на епикардната мастна тъкан и каротидната интима-медия се намират по-високи при ХХС и чернодробна цироза, нарастват с Child-Pugh скората и с показатели на напреднало чернодробно увреждане като серумен албумин, тромбоцитопения, размер на слезката и диаметър на порталната вена [17].

## **8. Чернодробна стеатоза при ХХС**

Мастната тъкан като ендокринен орган, в условията на дисфункция, допринася за ИР и метаболитен синдром - повишена коремна обиколка, дислипидемия (хиперглицеридемия, хиперхолестролемия, понижен HDL), артериална хипертония, дисгликемия [3]. Асоциацията на НАСБ със затлъстяването, метаболитния синдром, ЗДТ2 е силна и определя повишен сърдечно-съдов риск и смъртност [23]. Типична за НАСБ е атерогенната (комбинирана) дислипидемия съчетаваща повишени нива на ТГ, LDL и Апо-В, и понижени нива на HDL [40, 83, 146].

Чернодробната стеатоза се среща по-често сред хронично инфектираните с HCV (40-86%, средно 55%) от общата популация (20-30%) или при пациенти с други хронични чернодробни заболявания (19-50%). Хроничната HCV инфекция се свързва с особености в метаболитния профил, отличаващ го от „типичния“ метаболитен синдром с по-ниски стойности на серумните липиди в сравнение с НАСБ. Среща се понятието HCV-асоцииран дисметаболически синдром. Чернодробната стеатоза при ХХС се дели на два вида според предпоставките си. При различен от генотип 3 те са инсулинова резистентност и наличието на генни полиморфизми предразполагащи към чернодробна стеатоза („метаболитна стеатоза“). При пациенти инфектирани с генотип 3 стеатозата е „вирус-индуцирана“, в корелация с вирусния товар, проявява се с ниски серумни липидни показатели и предпоставка за нея са характеристики на самия вирус - вирусните антигени, които нарушават регулацията на липогенните и експортни пътища в хепатоцита [4, 81, 136].

HCV Ag въздейства пряко върху вътреклетъчните липогенни пътища като повишава експресията на фактори активиращи синтазата на мастни киселини в хепатоцита. Този ефект е по-силно проявен от HCV Ag на генотип 3(a) на HCV, отколкото от същия на генотип 1(b). Дължи се на малки разлики в аминокиселинни последователности между HCV Ag на двата генотипа, които определят по-силна асоциация на генотип 3 с липидните капчици в хепатоцита. Извън вирусния фактор, липогенните пътища в хепатоцита се активират от хиперинсулинемия или хипергликемия. Хиперинсулинемията предизвиква и прилив на свободни мастни киселини от мастната тъкан към черния дроб. Относителните дялове на внесените свободни мастни киселини и де ново синтезираните е съответно 60% и 26% в образуването на чернодробната стеатоза при описания опит [67].

В търсене на патогенезата на чернодробната стеатоза при ХХС е проучвана ролята на пероксисомален-пролифератор активирани рецептори от типове алфа и гама (PPAR алфа, PPAR гама). Двата типа на рецептора изпълняват регулаторна функция във вътреклетъчното „изгаряне“ на мазнини и въглехидрати. Инактивирането им подхранва липогенните пътища в хепатоцита и води до образуване на липидни капчици. В черния дроб на пациенти с ХХС, при инфектираните с генотип 3 на вируса, се намира по-ниска експресия на PPAR алфа и гама, отколкото при тези с генотип 1. При генотип 3 експресията на тези вътреклетъчни фактори е идентична при наличие и липса на чернодробна стеатоза. При инфектираните с генотип 1, експресията им е по-ниска в пробите с чернодробна стеатоза. Резултатът демонстрира различното

относително въздействие на вирусните и метаболитните фактори при тези два генотипа на HCV на вътреклетъчно рецепторно ниво [38]. При генотип различен от 3, механизмът на стеатогенеза наподобява този при НАСБ. Ролята на компонентите на метаболитния синдром за развитието на чернодробната стеатоза при ХХС генотип 1 е значителна. ИР и дисгликемията, освен че отразяват метаболитното състояние на организма, се свързват и със значителен профибротичен потенциал [4, 15, 79, 82, 91].

В патогенезата на чернодробната фиброза при НАСБ, освен възпалението, се предполага директно действие на хиперинсулинемията и хипергликемията върху експресията на растежни фактори съдействащи за активацията и пролиферацията на миофибробластите. По-подобие на НАСБ, повишения ИТМ и абдоминално затлъстяване действат като кофактори утежняващи чернодробното увреждане при ХХС. ИР и високите стойности на НОМА-IR като неин сурогатен маркер, се приемат за фактор допринасящ за прогресия на чернодробното увреждане [116, 143]. Чернодробната стеатоза, ИР и метаболитния синдром при ХХС са по-чести отколкото в общата популация неинфектирани с HCV (включително при пациенти с хроничен хепатит В). Когато е налице една от тези предпоставки, или съчетанието им, те се асоциират с напреднало чернодробно заболяване (F3-F4) и при двата типа хроничен вирусен хепатит [12].

Нискостепенната системна възпалителна активност при метаболитен синдром, но и при хроничната HCV инфекция, води до намалена чувствителност към действието на инсулина, повишени нива на свободни мастни киселини и оксидативен стрес. Повишените нива на проинфламаторни цитокини като интерлевкин-6 и TNF алфа при пациенти с ХХС, произхождащи от инфекцията и от абдоминално затлъстяване, също допринасят в развитието на ИР и стеатоза. Наличието на чернодробна стеатоза се свързва с по-голяма честота и тежест на нарушения в глюкозната обмяна и влошена прогноза на базата на ускорена прогресия на чернодробното увреждане и кардиометаболитен риск. Чернодробната стеатоза оказва отчетливо негативен ефект върху отговора на лечението с базирани на интерферон алфа терапевтични схеми при ХХС [4, 11, 164].

В генезата на нискостепенната системна възпалителна активност участват клетките на ММФС, които при ХХС остават продължително активирани в резултат на вирусните антигени, разпознаване на транслоцирани бактериални ендотоксини и интерферон гама. В израз на това при пациенти с ХХС се измерват повишени

концентрации на разтворимия CD14 рецептор от тези при здрави лица. Концентрациите на този протеин са по-високи при наличието на чернодробна цироза при ХХС [41, 70].

Генетична предпоставка за чернодробна стеатоза при ХХС се установява при наличието на мононуклеотидни генни полиморфизми в два известни до момента гена – IL28B и PNPLA3. Благоприятният за интерфероново лечение СС вариант при IL28B гена при пациенти инфектирани с HCV генотип 1 се асоциира с по-ниска честота на чернодробна стеатоза в сравнение с СТ и ТТ вариантите. Ефектът на този генетичен фактор е независим от нивата на серумни липиди [151]. Значението на PNPLA3 гена за НАСБ е потвърдено в множество проучвания. Полиморфизмите (p.148I/I, p.148I/M, p.148M/M) в този ген са най-значими сред проучваните генетични фактори и ефектът им се усилва от наличието на затлъстяване. Така рисковият фактор за НАСБ е затлъстяването, а предразположението към НАСБ се състои в генетичния вариант. При наличие на затлъстяване и чернодробна стеатоза, p.148I/M и p.148M/M вариантите на PNPLA3 определят по-високи нива на АЛТ и риск от прогресия на НАСБ до чернодробна цироза [87, 141].

Полиморфизмите в PNPLA3 гена имат значение и за чернодробната стеатоза при ХХС. Честотата и тежестта на стеатозата зависят едновременно и от вирусния генотип. При пациенти с ХХС генотип 1 генетичните варианти p.148I/M и p.148M/M се асоциират с по-голяма честота и тежест на чернодробната стеатоза в сравнение с пациентите носещи варианта p.148I/I. Влиянието на генетичните варианти при пациентите с хронична HCV генотип 1 инфекция се увеличава при наличие на абдоминално затлъстяване [171]. Вариантите на PNPLA3 свързани с по-висока честота и тежест на стеатозата се асоциират и с по-слаб отговор на интерферон алфа базирана терапия, както и с ускорена прогресия на чернодробното заболяване [154]. При сравнение между пациенти с ХХС генотип 2 и 3 е установено, че по отношение на PNPLA3 полиморфизмите и ИР, генетичния вариант p.148M/M е свързан с повишена ИР при ХХС генотип 2, но не при генотип 3. ХХС генотип 3 не е асоцииран сам по себе си с ИР, въпреки характерната за тази хронична инфекция чернодробна стеатоза. Генетичните варианти в гена за PNPLA3 не допринасят значително за наличието или тежестта на стеатозата при генотип 3, за разлика от ХХС генотип 1 [129]. Съобщенията за ИР при HCV генотип 1 произхождат от проучването на най-голям брой пациенти в сравнение с други генотипове на инфекцията. Между ИР и чернодробната стеатоза при ХХС има двупосочна връзка. Вирусните антигени и ИР водят до чернодробна стеатоза, а последната също засилва ИР и благоприятства вирусните процеси [118].

Литературните данни за оценка на чернодробната стеатоза и метаболитните прояви при ХХС обхващат предимно пациенти с широко разпространените генотип 1, 2 и 3. Проучвания включващи пациенти с HCV генотип 4 демонстрират сходство на метаболитния профил с този при генотип 1 [102].

Натрупани са доказателства за ИР и повишен риск от ЗДТ2 при пациенти с ХХС [62, 118, 164]. При проучване с хиперинсулинемична-еугликемична кламп-техника на група пациенти с предимно ХХС генотип 3, се наблюдава намалена оксидация на глюкозата и намаленото ѝ с 25% усвояване в периферните тъкани - базално и в отговор на приложен инсулин, в сравнение със здравите лица. По-високи са базалните нива на глицерол и кетони в отговор на действието на инсулина спрямо контролната група от здрави лица. Ендогенната продукция на глюкоза при пациентите с ХХС надвишава с около 20% тази при здрави лица и ефектът на инсулина върху потискането и е отслабен. Типа на метаболитните промени говори в полза на дисрегулация между глюкозната и липидната обмяна с компенсаторно повишена оксидация на триглицеридите. Така за разлика от ИР при НАСБ, ИР при ХХС е белязана от високи нива на инсулин и повишена ендогенна глюкозна продукция, докато високите стойности на серумните триглицериди са нехарактерни [158]. Въпреки че ИР, изразена в повишен НОМА-IR, е еднакво характерна за ХХС и НАСБ, значителна част от пациентите с ХХС са „пощадени” от метаболитен синдром по възприетите диагностични критерии поради по-ниската честота на хиперлипидемия. При НАСБ ИТМ и триглицеридните нива са определящи за наличието на ИР, докато при ХХС ИР се асоциира със стадия на чернодробна фиброза и с мъжкия пол [81].

Глюкозните измервания не показват различия между пациентите инфектирани с генотип 1 и 3, въпреки по-изразения стеатогенен ефект на ХХС генотип 3. Не е нарушена инсулиновата секреция от панкреасните бета-клетки при ХХС. ИР, която изследователите намират е в по-голяма степен периферна, произхождаща от подкожната мастна тъкан и мускулатурата, отколкото чернодробна. Отдава се на комбинация от фактори - повишено съдържание на триглицериди в напречно набраздените мускулни влакна, повишена концентрация на проинфламаторни цитокини и възпрепятстване на инсулиновата сигнализация от вирусните антигените. Очертан е един инфекциозно-възпалителен модел на ИР типичен за ХХС. Сред проучената група няма пациенти със затлъстяване, ЗДТ2 и метаболитен синдром. Отделните приноси на метаболитните фактори и на вирусната инфекция в измерването на инсулиновата резистентност не могат да бъдат точно измерени с наличните методи [97, 158].

При пациенти провели противовирусна терапия с пегилиран интерферон и рибавирин с постигане на ТВО се наблюдава значим спад в показателите на ИР – НОМА-IR и подобрена панкреасна бета-клетъчна функция. В биопсичен материал от последователни чернодробни биопсии преди и след терапия, с имуноблот и имунохистохимични методи се доказва трикратно повишена експресия на вътреклетъчните инсулин-рецепторните субстрати 1 и 2 при отговорилите на терапия пациенти. Локализацията на хепатоцитите, в които се отбелязва възстановяване на вътреклетъчния път на инсулинова сигнализация е предимно в перипорталната зона. В проучваната група няма значими промени в телесното тегло преди и след терапията при отговорилите. В групата на неотговорилите се отчита значим спад на телесното тегло без промяна в проследените показатели на ИР. Липсват данни за генотипа на HCV, оценка на чернодробната фиброза и стеатоза при участниците в това проучване [71].

ИР е характерна за ХХС генотип 1 – оценяват се по-високи стойности на НОМА-IR в сравнение с пациенти с ХХС генотип 2 и 3. Високите показатели на ИР се асоциират с наличието на сигнификантна фиброза при пациенти с HCV генотип 1 инфекция. След лечение с интерферон алфа и рибавирин, при пациентите с ХХС генотип 1 постигнали ТВО се наблюдава подобрение в инсулиновата чувствителност като значим спад в стойностите на НОМА-IR. Подобрението е независимо от придружаващите метаболитни фактори и се отдава на елиминирането на вирусната инфекция. При пациентите с генотип 2 и 3, независимо от вирусологичния отговор на терапията, както и при неотговорилите на терапия пациенти с генотип 1, не се променят стойностите на НОМА-IR [150].

## **9. Пространствени взаимоотношения на метаболитните процеси, чернодробната фиброза и стеатоза в чернодробния паренхим**

Във функционалния модел чернодробното делче и чернодробния ацинус, хепатоцитите разположени в близост до портален тракт са със съгъстена подредба и първи срещат смесената в синусоидите портална и артериална кръв. В тази зона на ацинуса (Зона 1) кръвната смес е относително по-високо оксигенирана и богата на хранителни вещества. В хепатоцитите от зона 1 се синтезира по-голямата част от ендогенния холестерол, извършва се интензивно глюконеогенеза, бета-окисление на мастните киселини и се дезаминират аминокиселини. Хепатоцитите в зоната близка до централна вена в ацинуса (Зона 3) са с рехавата подредба и последни срещат кръвната

смес от синусоидите преди да се влее в централната вена. В зона 3 синусоидалната кръв е относително по-ниско оксигенирана и изчерпана откъм хранителни вещества. Повишено е съдържанието на метаболити образувани при активните процеси в предходните две зони. В Зона 3 интензивно протичат гликолиза, гликогеногенеза, де ново липогенеза, синтезира се глутамин и се трансформират ксенобиотици. Еднакво отдалечените от перипорталното пространство и централната вена хепатоцити образуват преходна зона (Зона 2), която е с междинни характеристики спрямо Зона 1 и Зона 3 [2, 133]. Морфологичния субстрат на зоновите метаболитни различия са разликите в експресията и активността на ензимните системи катализиращи съответните процеси. Част от ензимите са строго специфични за хепатоцитите в определена зона, а други присъстват в различна степен в хепатоцитите от всички зони. Промяна в зоналността на метаболитните процеси може да настъпи временно при променени условия в организма за поддържане на хомеостазата. Продължителното съществуване на нарушена зоналност обичайно е свързано в основата си с хроничен патологичен процес, например чернодробна стеатоза [133].

Ензимът глутамин синтаза, характерен за хепатоцитите от зона 3, се намира дифузно разпространен в чернодробните делчета при ХХС. Синтазата на мастни киселини, с типична висока експресия в зона 1, се намира високо експресирана в зона 3 при ХХС и чернодробна стеатоза. Ензимните маркери са проучени в животински модели и биопсичен чернодробен материал от пациенти с ХХС [101]. Променената зоналност в ензимната експресия предхожда образуването на липидни капчици в метаболитно увредените хепатоцити. Инфектираните с HCV хепатоцити са гнездовидно пръснати в чернодробния паренхим и не представляват цялата хепатоцелуларна маса. Инфектирането е възможно да достигне приблизително половината хепатоцелуларна маса, когато е налице висок вирусен товар. Разпространението на вируса в чернодробния паренхим не съвпада на разпространението на липидните отлагания. Метаболитното увреждане и чернодробната стеатоза обхващат чернодробния паренхим дифузно - често в повече от възможно инфектираните хепатоцити [165].

Чернодробната фиброза и стеатоза при ХХС, токсично, и метаболитно чернодробно увреждане показват различия в пространствено отношение. Характерно за ХХС е образуването на фиброза първоначално перипортално, където е и най-активната имунна реакция срещу патогена. За сравнение при алкохолна чернодробна болест и НАСБ фиброза се формира първоначално около централната вена и перицелуларно.

Стеатозата при ХХС първоначално се образува в перипортално. Алкохолната стеатоза и НАС по-често засяга всички зони едновременно, или предимно около централната вена. Когато чернодробната стеатоза се образува начално около централната вена, капчиците имат склонност да се сливат и да увеличават средния си размер. Напредването на чернодробната фиброза преодолява условните граници между зоните. Изградените порто-портални, порто-централни и центрo-централни фиброзни септи нарушават нормалната архитектура на чернодробния паренхим при образуването на чернодробна цироза [2, 73, 170].

## 10. Обобщение

При ХХС настъпват промени в липидната обмяна, които имат значение за поддържането на хроничната инфекция, формирането на чернодробна стеатоза и зависят от стадия на чернодробната фиброза. Навлизането на богати на холестерол частици в хепатоцитите и изнасянето в кръвотока на богати на триглицериди VLDL и VLDL-подобни липовирочастици благоприятства вирусния жизнен цикъл. Чернодробната стеатоза и липовирочастиците свързват генетичните, имунните и метаболитните механизми на ХХС. Серумните липидни показатели търпят промени според стадия и характеристиката на чернодробната болест при ХХС. Съществуват междугенотипни различия в степента на асоциация на HCV с интрацелуларните и серумните липиди. Елиминирането на вирусната инфекция води до нарастване на общия холестерол и богатите на холестерол липопротеини.

Липсват достатъчно данни за приложимостта на отделните липидни показатели и съотношенията им в оценката на чернодробната стеатоза и фиброза при ХХС. Проучването на серумните липиди може да даде повече възможности за използването им в неинвазивната оценка на чернодробното увреждане и прогнозата на болестта. Наличните към момента методи за неинвазивно стадиране на чернодробната фиброза самостоятелно не могат да заместят чернодробната биопсия като референтен стандарт. Могат да бъдат съчетавани методи от разнотипни неинвазивни методи, което повишава успеваемостта в стадирането на хроничното чернодробно заболяване при ХХС.

Чернодробната стеатоза има участие в чернодробното увреждане и извънчернодробните прояви на болестта при ХХС. ИР съпътства ХХС и се дължи едновременно на традиционните метаболитни фактори и на вирусните фактори - пряко действие на вирусните антигени върху различни нива на инсулиновата сигнализация и

нискостепенна системна възпалителна активност. ИР при пациенти с ХХС и метаболитни нарушения подхранва прогресията на чернодробната фиброза.

В имунните механизми на чернодробното увреждане и в резолюцията на възпалението, и чернодробната фиброза при ХХС основна участие имат клетките на ММФС и цитотоксични лимфоцити. Активираните имуноцити създават среда на възпаление, която се поддържа автокринно на базата на множество хемоатрактантни молекули, сигнали за клетъчно увреждане и антигени. Активирането и трансдиференциацията на звездовидни клетки до миофибробласти дава началото на фиброгенезата като трайно последствие на възпалението и прогресиращо структурно увреждане на чернодробния паренхим. MCP-1 е ключов медиатор в сигнализацията между клетките на моноцитно-макрофагеалната система. Хемокинът се асоциира с липидни молекули в кръвотока и артериалната съдова стена. Това налага проучването му във връзка с липидната обмяна, участието му в образуването на чернодробна стеатоза и в кардиометаболитните екстрахепаталните прояви на хроничната HCV инфекция. Клетъчният имунитет участва в чернодробното увреждане, чернодробната фиброгенеза и фибролиза при ХХС. Продължителното активиране на клетъчния имунитет, чернодробната стеатоза и непълноценната фибролиза могат да бъдат предпоставка за прогресия на чернодробното заболяване след успешно противовирусно лечение при ХХС.

ХХС е съпроводен с повишен кардиометаболитен риск. Оценката или стратифицирането на този риск според нивата на липидните показатели при пациенти с ХХС не е ненадежно заради описаните липидни промени свързани с хода на HCV инфекцията и чернодробната болест. Развитието на чернодробната стеатоза и фиброза, рефлектира и в нарастване на кардиометаболитния риск. В оценката на риска са уместни измерванията на дебелината на каротидната интима-медиа, търсенето на сърдечна левокамерна хипертрофия, оценка на самото чернодробното увреждане като тежест и характеристика.

HCV инфекцията предизвиква промени в обичайното зонално разпределение на метаболитните процеси в чернодробния ацинус. Промяната в ензимната експресия води до намаляване на ефективността на метаболитните процеси и функционално натоварване на част хепатоцитите. В резултат тези хепатоцитите са по-податливи на метаболитно в допълнение към възпалителното увреждане. Механизмите на възпаление, фиброгенеза и метаболитните нарушения при ХХС взаимно се потенцират в прогресията на хроничното чернодробно заболяване.

## **IV. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **1.Цел**

**Да проучим значението на серумните общ холестерол, HDL, LDL, VLDL, триглицериди, Lp (a) и MCP-1 за хода на болестта, оценката на чернодробната фиброза и стеатоза при хроничен хепатит С генотип 1 и 3.**

### **2. Задачи**

- 1) Да оценим промените в серумните нива на Lp (a) при пациенти с ХХС с и без стеатоза, и да сравним с тези при НАСБ
- 2) Да оценим промените в липидния статус в зависимост от стадия и характеристиката на чернодробно увреждане при пациенти с HCV инфекция с генотип 1 и 3
- 3) Да потърсим използвани в практиката липидни маркери за оценка на стадия и характеристиката на чернодробно увреждане при ХХС
- 4) Да оценим метаболитните фактори и да потърсим връзката им с клинични и лабораторни показатели на чернодробно увреждане при пациентите с ХХС
- 5) Да сравним серумните нива на MCP-1 между пациенти с ХХС с и без напреднала чернодробна фиброза, с и без стеатоза
- 6) Да проследим промените в серумните нива на MCP-1 и липиди при пациенти с HCV инфекция след противовирусно лечение

## V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Изследвани лица

Включихме в изследванията и анализирахме данните на общо 242 лица - 162 с ХХС и 80 с НАСБ, изследвани и лекувани в Клиника по гастроентерология към УМБАЛ "Св. Иван Рилски", разпределени в следните основни групи:

#### Група I

Серумните нива на Lp (a) оценихме при 80 лица с първична НАСБ (мъже-44, жени -36) на средна възраст  $42.94 \pm 10.30$  г. (от 21 г. до 65 г.). Дефинирахме наличието на дислипидемия с едно от следните отклонения: общ холестерол  $> 5$  mmol/l, LDL  $> 3.5$  mmol/l, HDL  $< 1.0$  mmol/l за мъже и  $1.3$  mmol/l за жени, and триглицериди  $> 1.7$  mmol/l. Приехме стойности на серумните Lp (a)  $> 25$  mg/dl за дислипидемия. Стойностите на метаболитните показатели и показатели свързани с повишен сърдечно-съдов риск, чернодробните ензими при пациенти с НАСБ са представени в Таблица 1 и 2. Честотата на повишени стойности на чернодробните ензими беше за: АЛТ -30% , АСТ - 12.5% и ГГТ - 31% .

**Таблица 1. Стойности на метаболитните показатели при пациенти с НАСБ.**

Показатели	Средна стойност	Стандартно отклонение	Min	Max
ИТМ	29.01	4.31	20.99	42.80
Общ холестерол	5.67	0.84	4.07	7.99
Триглицериди	2.35	3.35	0.47	25.30
HDL	1.29	0.44	0.64	4.41
LDL	3.37	1.01	0.63	5.37
Триглицериди / HDL	2.10	3.19	0.25	22.00
Глюкоза	5.67	0.84	4.07	7.99

**Таблица 2. Стойности на чернодробните ензими при пациенти с НАСБ.**

Показатели	Средна стойност	Стандартно отклонение	Min	Max
АСТ	27.63	1.94	10	104
АЛТ	44.03	4.30	10	199
ГГТ	65.78	9.81	6	505

С нормално телесно тегло бяха 13% от изследваните лица, с наднормено – 41% и със затлъстяване -46%. Покриващи напълно критериите за метаболитен синдром бяха 44% от пациентите с НАСБ. Честота на абдоминално затлъстяване - 85%, артериална хипертония - 54%, повишен общ холестерол / LDL - 47% и 42.5%, намален HDL - 30%, повишени триглицериди 30%, едновременно отклонение в триглицеридите и HDL - 16%, отношението триглицериди/HDL > 2 - 24% (стойност > 4 - 7.5%), НГТ - 47.5%.

Сравнихме стойностите на Lp(a) в тази група и 112 пациенти от подгрупа (1) със ХХС генотип 1 и 3 (75 със данни за съпътстваща чернодробна стеатоза и 37 без данни за стеатоза)

## **Група II**

Пациенти с ХХС генотип 1 и 3 - общо 162 пациенти анализирани в три подгрупи.

**Подгрупа (1)** - 112 пациенти (54 мъже, 58 жени, на средна възраст 48.6±13.7 години) с хроничен хепатит С, лекувани в Клиника по гастроентерология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” ЕАД – София, изследвани в рамките на проект „Роля на серумните липиди във вирусната кинетика, патогенезата и терапевтичния отговор на хроничната HCV инфекция. Проследяване и съпоставяне на липидния статус с клинични, образни, лабораторни, вирусологични и хистологични методи за оценка на чернодробното заболяване” съфинансиран по програма „Млад изследовател” на Съвет по медицинска наука към Медицински университет – София - ДОГОВОР №14-Д/2014 г.

**Подгрупа (2)** - 20 от пациентите от Подгрупа (1) и един пациент с ХХС генотип 1 след приключване на проекта. Общо 21 пациенти с ХХС генотип 1 и 3 изследвахме за серумна концентрация на MCP-1 в следващо проучване, което включваше и проследяваща втора серумна проба. Проведени бяха проследяващи изследвания на

серумни МСР-1 и липидни нива поне шест месеца след приключване на противовирусната терапия.

Изходна характеристика на 113 лица общо за **Подгрупи (1) и (2)** [Таблица 3 а, б]:

1. Включващи критерии: ХХС, възраст над 18 години, писмено информирано съгласие.
2. Изключващи критерии: противовирусно лечение в ход, декомпенсирана чернодробна цироза (в това число с история за кървене от варици, ХЦК), малигнени заболявания, алкохолна злоупотреба, употреба на психоактивни вещества, коинфекция с човешки имунодефицитен вирус (HIV), доминантна коинфекция с HBV, неконтролиран хипер- или хипотиреоидизъм, с първична хиперлипидемия и/или приемащи липидопонижаващи медикаменти.
3. HCV генотипизиране – 99 от участниците бяха с ХХС генотип 1, а 14 с генотип 3.
4. Тежест на чернодробното увреждане – ХХС със стадий на чернодробна фиброза от начална (F1) до септална фиброза без чернодробна цироза (F3) имаха 85 пациенти оценени по METAVIR. Пациентите с данни за напреднало чернодробно заболяване - стадий на чернодробна цироза (F4) бяха 28. Оценихме ги по Child-Pugh класификацията като клас А.
5. Ехографски и/или хистологични данни за чернодробна стеатоза имаха общо 76 пациенти (лека - при 58, умерена или по-тежка – при 18).
6. HCV РНК > 800 000 IU/ml количествено определихме при 53 пациенти, а 60 бяха с по-нисък вирусен товар.
7. История на противовирусно лечение - нелекувани към момента на включване в проуването бяха 82 пациенти с ХХС генотип 1 и 3. История на проведено противовирусно лечение без постигане на ТВО имаха 31 пациенти с ХХС генотип 1 и нито един с генотип 3.
8. Метаболитните нарушения при участниците:
  - Участниците, които покриха критериите за метаболитен синдром бяха 32
  - наднормено тегло имаше при 42, затлъстяване при 18 пациенти, от които I степен при 15 и II степен при 3
  - със ЗДТ2 бяха 14 участници, от които трима болни на инсулинолечение

- предиабет - нарушена гликемия на гладно и/или нарушен глюкозен толеранс имаха 30 участници
- ИР с НОМА-IR > 2.5 оценихме при 55 участници, при 25 от тях това беше единствено нарушение в глюкозната обмяна, а 20 имаха и предиабет
- Нормална гликемия имаше при 44 участници

9. Сърдечно – съдови заболявания имаха 43 от включените пациенти

- хипертонична болест I-II стадий имаха 25 пациенти
- хипертонична болест I-II стадий с исхемична болест на сърцето (ИБС) и/или ритъмно нарушение, без преживян сърдечно-съдов или мозъчно-съдов инцидент имаха 15 пациенти
- хипертонична болест III стадий с преживян сърдечно или мозъчно-съдов инцидент, или периферна съдова болест имаха 3 пациенти

10. Допълнителни данни

Положителни маркери за актуална или минала HBV инфекция имаха 5 болни:

- anti-HBc total при 3 пациенти
- HBsAg без доловима HBV ДНК и отрицателни тестове за делта вирусен хепатит (HDV) при 2 пациенти

Имуносупресивна терапия получаваха 2 от болните във връзка с трансплантиран бъбрек и 1 във връзка с придружаващ системен лупус еритематодес. Трима от изследваните болни бяха с хемофилия, един - с дефицит на фактора на Willebrand

**Таблица 3. Средни, минимални, максимални стойности и стандартно отклонение на лабораторните показатели при пациентите с ХХС генотип 1 и 3.**

а)

Показател	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
Възраст	21	80	48.58	13.69
HCV РНК IU/ml	4787	12973333	1451872	2011356
HCV РНК Ig	3.68	7.11	5.80	0.65
FIB-4 скор	0.20	16.51	2.43	2.52
APRI скор	0.22	9.83	1.25	1.4
АСТ	19	272	64.83	46.21
АЛТ	14	354	86.71	64.70
ГГТ	10	714	89.73	108.32
Тромбоцити $10^9/l$	41	396	200.11	74.73

б)

Показател	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
Инсулин	2	85.40	10.69	12.83
Глюкоза	3.77	20	6.08	1.93
НОМА-IR	0.5	20.34	2.83	3.52
ИТМ	18.73	36.07	25.97	3.99
Non-HDL	1.09	6.04	2.81	0.91
Общ холестерол	1.78	8.13	4.19	1
HDL	0.64	2.95	1.38	0.43
LDL	0.72	5.69	2.37	0.86
VLDL	0.11	1.06	0.44	0.17
Триглицериди	0.23	2.31	0.97	0.37
Lp(a) mg/dl	0.68	75.89	11.33	14.44
Пикочна киселина	175	522	245.98	145.77
TG/LDL	0.14	1.13	0.45	0.20

Характеристика на **Подгрупа (2)** - пациенти изследвани за МСР-1 и серумни липиди в две последователни проби. Характеристиката на подгрупата е представена в таблица [Таблица 4, 5 а, б и 6]. Включихме 21 пациенти в проучването (11 мъже, 10 жени, на възраст  $42 \pm 9.7$  год.). Телесното тегло беше нормално при 10, наднормено при 5 и със затлъстяване - 6 пациенти. С ХХС с генотип 1 бяха 17 от тях, а четирима с генотип 3. Чернодробна цирроза (F4) диагностицирахме при 3 пациенти (1 хистологично, 2 с други инструментални и лабораторни методи), а септална фиброза без цирроза (F3) при 2 пациенти. При всички останали фиброзата беше начална или сигнификантна (F1-F2) [Таблица 4].

**Таблица 4. Разпределение на пациентите с ХХС според стадий на фиброза.**

Група N=21 пациенти с ХХС		
Стадий на фиброза	F1-F2	F3-F4
Брой	N=16	N=5

**Таблица 5. Изходни характеристики на показателите в Подгрупа (2)**

а)

Показател	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
Възраст	29	56	42.14	9.7
HCV РНК IU/ml	6360	7974167	1383561	1966483
HCV РНК Ig	3.8	6.9	5.7	0.76
FIB-4 скор	0.33	4.73	1.48	1.37
APRI скор	0.23	4.05	0.95	1.12
АСТ	21	272	58.9	60.53
АЛТ	19	354	87.95	83.67
Тромбоцити $10^9/l$	57	381	229.14	80.16
Forns индекс	1.71	8.82	4.66	2.04
АСТ/АЛТ	0.35	1.47	0.72	0.26
TG/LDL	0.14	0.71	0.41	0.15

б)

Показател	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
МСП-1	150.5	712.4	315.76	140.7
Инсулин	2	39.8	12.32	8.93
Глюкоза	4.76	7.04	5.64	0.55
НОМА-IR	0.50	10.15	3.09	2.30
ITM	20.42	35.82	27.07	4.81
non-HDL	1.78	5.93	2.94	0.92
HDL/non-HDL	0.24	1.02	0.52	0.22
Общ холестерол	3.02	7.58	4.34	0.97
HDL	0.88	1.98	1.4	0.38
LDL	1.51	5.43	2.5	0.87
VLDL	0.17	1.06	0.44	0.18
Триглицериди	0.38	2.31	0.96	0.39
Lp (a) mg/dl	1.19	48.51	10.48	12.35
Пикочна киселина	192	459	328	70

Противовирусно лечение проведеха 17 пациенти, от които 12 със стандартна двойна терапия с пегилиран интерферон алфа и рибавирин. При 4 терапията беше тройна - добавяне на боцепревил при 2 и симепревил при 2 пациенти. Една пациентка проведе лечение с дасабувир/омбитасвир/паритапревил/ритонавир. Проследихме ги според утвърдените към периода, в който се проведе проучването, критерии за проследяване на лечение със стандартна двойна и тройна терапия. При пациенти, които не отговориха на лечението, то беше прекратено. При отчетен ранен вирусологичен отговор пациентите проведеха предвидения терапевтичен курс и бяха изследвани шест месеца след края му с проба II. Пробите бяха събрани преди започване на противовирусно лечение [Таблица 6] и шест месеца след приключването му [Таблица 7]. Участници, при които не се долови вирусен товар в тази проба приехме за постигнали ТВО, а тези, при които се измери количествено вирусен товар приехме за релапсирани [Таблица 8]. При нелекуваните 4 пациенти втората проба беше в интервал от 6 до 18 месеца след първата [Таблица 9]. Изследвахме във проба II МСП-1 и нива на серумните липиди.

**Таблица 6. Изходни характеристики и показатели (Проба I) при 12 пациенти постигнаха ТВО след лечение.**

Показатели Проба I	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
МСП-1	150.5	420.8	291.37	77.31
Възраст	29	55	38.08	9.36
HCV РНК IU/ml	6360	5325833	1008857	1468417
HCV РНК Ig	3.8	6.73	5.55	0.84
Инсулин	2.00	18.00	9.72	5.07
Глюкоза	4.95	6.41	5.52	0.42
НОМА-IR	0.50	5.13	2.34	1.33
ИТМ	20.42	32.14	25.68	4.28
Non-HDL	2.14	5.93	3.18	1.09
HDL/Non-HDL	0.24	0.82	0.46	0.18
Общ холестерол	3.02	7.58	4.54	1.23
HDL	0.88	1.98	1.37	0.4
LDL	1.79	5.43	2.75	1.02
VLDL	0.17	1.06	0.42	0.22
Триглицериди	0.38	2.31	0.93	0.48
Lp (a) mg/dl	1.33	31.13	9.65	9.35
FIB-4 скор	0.33	3.88	1.28	1.3
APRI скор	0.23	3.49	0.94	1.11
АСТ	21	160	55.17	45.67
АЛТ	19	263	89.58	70.32
Тромбоцити $10^9/l$	112	381	232.5	82.23
Пикочна киселина	214	433	330	63.91
Forns индекс	1.71	7.41	4.04	2.11
TG/LDL	0.14	0.71	0.36	0.17
АСТ/АЛТ	0.35	1.47	0.67	0.28

**Таблица 7. Показатели в Проба II при 12 пациенти постигнаха ТВО след лечение.**

Показатели Проба II	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
MCP-1	263.4	525.6	374.15	72.34
Non-HDL	1.98	4.89	3.31	0.85
HDL/Non-HDL	0.27	0.81	0.43	0.17
Общ холестерол	3.56	6.57	4.64	0.93
HDL	0.89	2.03	1.33	0.33
LDL	1.63	4.43	2.91	0.76
VLDL	0.23	0.6	0.41	0.11
Триглицериди	0.50	1.33	0.89	0.25
Lp (a) mg/dl	1.18	32.58	9.54	9.41
TG/LDL	0.19	0.50	0.32	0.12

**Таблица 8. Изходни характеристики (Проба I) при 9 пациенти с активна HCV инфекция – 5 неотговорили на терапия и 4 нелекувани.**

Показатели <b>Проба I</b>	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
МСП-1	164.3	712.4	348.28	197.97
Възраст	34	56	47.56	7.54
HCV РНК IU/ml	64260	7974167	1883166	2492265
HCV РНК Ig	4.81	6.9	5.95	0.62
Инсулин	4.95	39.8	16.78	12.47
Глюкоза	4.76	7.04	5,82	0.67
НОМА-IR	1.04	10.15	4.29	3.16
ИТМ	21.22	35.82	28.92	5.11
Non-HDL	1.78	3.27	2.62	0.54
HDL/Non-HDL	0.30	1.02	0.59	0.26
Общ холестерол	3.56	4.55	4.06	0.38
HDL	0.97	1.88	1.44	0.38
LDL	1.51	2.79	2.17	0.48
VLDL	0.27	0.60	0.45	0.11
Триглицериди	0.63	1.34	1	0.25
Lp (a) mg/dl	1.19	48.51	11.58	16.08
FIB-4 скор	0.58	4.73	1.75	1.49
APRI скор	0.27	4.05	0.97	1.21
АСТ	23	272	63.89	79.01
АЛТ	27	354	85.78	103.41
Тромбоцити 10 <sup>9</sup> /l	57	358	224.67	82.01
Пикочна киселина	192	459	325	80.64
Forns индекс	3.07	8.82	5.48	1.71
TG/LDL	0.36	0.65	0.47	0.11
АСТ/АЛТ	0.37	1.17	0.8	0.22

**Таблица 9. Показатели в Проба II при 9 пациенти с активна HCV инфекция – 5 неотговорили на терапия и 4 нелекувани.**

Показатели Проба II	Min	Max	Средна стойност	Стандартно отклонение
MCP-1	203.1	600.2	376.41	134.74
Non-HDL	1.62	3.67	2.8	0.67
HDL/Non-HDL	0.30	1.35	0.6	0.36
Общ холестерол	3.34	4.77	4.29	0.51
HDL	0.91	2.19	1.49	0.47
LDL	1.38	3.35	2.51	0.58
VLDL	0.33	0.74	0.48	0.12
Триглицериди	0.71	1.62	1.05	0.27
Lp (a) mg/dl	0.28	47.37	10.67	15.46
TG/LDL	0.29	0.67	0.43	0.12

**Подгрупа (3)** 49 пациенти с ХХС неразделени по генотип, без клинични, образни и лабораторни данни за асцит, остро чернодробно увреждане, чернодробен застой и екстрахепатална холестаза, при които проведехме транзиторната еластография. Съпоставихме резултатите с хистологичната оценка по METAVIR.

С чернодробна цироза (F4) бяха 17 пациенти. Напреднала септална фиброза без цироза (F3) имаха 7, сигнификантна фиброза (F2) -13, а начална фиброза (F1) – 12 пациенти. Стеатоза по ехографски и/или хистологични данни имаше при 9 пациенти. Повишен АЛТ от 2 до 5 пъти над ГРГ имаха 9 пациенти [Таблица 10].

**Таблица 10. Брой пациенти с ХХС според стадия на чернодробна фиброза и наличието на повишение в активността на АЛТ.**

Чернодробна фиброза (METAVIR)	Брой пациенти	АЛТ>2xГРГ
F1	12	2
F2	13	2
F3	7	0
F4	17	5
F1-F2	25	4
F3-F4	24	5

## 2. Използвани методи

Диагнозата на ХХС и НАСБ бе поставена по утвърдени критерии - анамнестично, физикално, с изобразителни, инструментални, хистологични, лабораторни, имунологични, серологични, молекулярни и други специализирани изследвания, съвместими със съответната диагноза [42, 43].

Анамнеза и насочена анамнеза за алкохолната консумация. Оценката на алкохолната консумация извършихме по анамнестични данни на базата на вида на алкохола, количество за ден или седмица. Пациенти с по-висока от 40 гр дневно алкохолна консумация за двата пола не бяха включени в изследванията.

Физикален статус, демографски данни, ИТМ, коремна обиколка, измерена през пъпа. Промените в телесното тегло оценихме според главните прагове на Международната класификацията на Световната здравна организация (СЗО) за поднормено, наднормено тегло и затлъстяване при възрастни според ИТМ, адаптирана през 2006 [149][Таблица 11].

**Таблица 11. Класификация на телесното тегло според ИТМ.**

Група	ИТМ кг/м <sup>2</sup>
Поднормено тегло	< 18.5
Нормално тегло	18.5 – 24.99
Наднормено тегло	25.0 – 29.99
Затлъстяване	> 30.0
- Степен I	30.0 – 34.99
- Степен II	35.0 – 39.99
- Степен III	> 40

За диагнозата метаболитния синдром използвахме критериите от Национален консенсус за поведение при метаболитен синдром приет от работна група към Българския институт “Метаболитен синдром” (БИМС) през 2010 г [3] . За метаболитен синдром приехме наличие на поне 3 от изброените 5 критерии:

- повишена обиколка на талията - за мъже  $\geq 94$  cm, за жени  $\geq 80$  cm;
- повишени нива на триглицеридите -  $\geq 1.7$  mmol/l.

- намалени нива на HDL - по-малко от 1.0 mmol/l за мъже, по-малко от 1.3 mmol/l за жени.
- повишено артериално налягане - систолно  $\geq 130$  mmHg и/или диастолно  $\geq 85$  mmHg или прием на антихипертензивни медикаменти при анамнеза за хипертония.
- повишена плазмена глюкоза на гладно  $\geq 5.6$  mmol/l или прием на хипогликемизиращи медикаменти.

За категоризиране на дисгликемията като предиабет или ЗДТ2, използвахме критерии на СЗО и Международната диабетна федерация от 2006 г.[167].

1. Плазмена глюкоза на гладно равна или по-висока от 6.1 mmol/l и по-ниска от 7.0 mmol/l - „нарушена гликемия на гладно” (НГГ).
2. Плазмена глюкоза между 7.8 mmol/l и 11.1 mmol/l на 2-я час при орален глюкозотолерансен тест (ОГТТ) – „нарушен глюкозен толеранс” (НГТ)
3. ЗДТ2: При поставена клинична диагноза в миналото или новооткрит ЗДТ2 с плазмена глюкоза на гладно равна или по-висока от 7 mmol/l. Глюкоза на 2-я час при ОГТТ равна или по-висока от 11.1 mmol/l .

Образни, инструментални и лабораторни изследвания:

- абдоминална ехография и Доплер изследване
- фиброгастроскопия - скрининг за варици на хранопровода
- чернодробна биопсия
  - при болните с ХХС използвахме оценката по METAVIR
  - чернодробната стеатоза при пациенти с ХХС оценихме в три степени на тежест според процента на хепатоцити засегнати от липидни отлагания: липсва стеатоза < 5%, лека стеатоза 5%-33%, умерена стеатоза 33%-66%, тежка стеатоза > 66%
  - при болните с НАСБ степента на стеатоза, възпалителна активност и стадия на фиброза оценихме според критериите на Brunt [28].
- Проведохме лабораторни изследвания - пълна кръвна картина, АСТ, АЛТ, ГГТ, алкална фосфатаза, общ и директен билирубин, общ белтък, албумин,

креатинин, глюкоза, серумен инсулин на гладно, пикочна киселина, протромбиново време, фибриноген, общо изследване на урина.

- Оценката на инсулиновата резистентност извършихме на базата HOMA-IR изчислен от стойностите на инсулина ( $\mu\text{IU/ml}$ ) и глюкозата ( $\text{mmol/l}$ ) на гладно по следната формула [92]:

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{инсулин} \times \text{глюкоза}}{22.5}$$

- Изчислихме индекси за неинвазивно предсказване на стадия на чернодробна фиброза според формули от валидиращи проучвания (FIB-4 скор, Forns индекс, APRI скор, АСТ/АЛТ)
- Нивото на вирусен товар HCV РНК в IU/ml количествено определихме с обратнотранскриптазна „real-time” полимеразноверижна реакция (RT „real-time” PCR) и генотипизирахме HCV
- Измерихме нивата на серумните липидни показатели: общ холестерол, HDL и триглицериди с рутинни лабораторни методи
- Изчислихме LDL, VLDL и non-HDL според възприетите закономерности от уравнението на Friedewald адаптирано в mmol/l. Сред изследваната група нямаше стойности на триглицеридите над 5 mmol/l [49]:

$$\text{LDL} = \text{общ холестерол} - \left( \text{HDL} + \frac{\text{триглицериди}}{2.2} \right)$$

- Non-HDL получихме като разликата между общия холестерол и HDL
- изчислихме съотношения между липидните показатели
- Всички серумни проби бяха взети в сутрешни часове, при стандартни условия и след 12 часов период на гладуване

## Специализирани изследвания

### 1) Количествено измерване на Lp (a)

Определихме серумно количество Lp (a) по имунотурбидиметричен метод усилен с частици, с реактиви LPA (Roche Diagnostics) съвместими със системи COBAS INTEGRA в Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Иван Рилски” ЕАД – София. Стойностите получихме в nmol/l, преизчислихме и в mg/dl за целите на статистическия анализ и за сравнение с наличните литературни данни.

Коефициент за конвертиране предоставен от производителя на реактивите:

$$\text{Lp(a) nmol/l} \times 0.4167 = \text{Lp(a) mg/dl},$$

### 2) Определяне на серумен MCP-1 чрез имуноензимен метод

За определяне на MCP-1 в серум използвахме реактиви за човешки MCP-1 с търговско наименование Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA (R&D systems, САЩ).

**Принцип на метода:** Методът представлява количествен „сандвич” имуноензимен метод (ELISA) за *in vitro* определяне на човешки MCP-1 в биологични материали. Гнездата на микротитърната плака са натоварени с високоспецифични антитела срещу човешки MCP-1. По време на първия инкубационен период се извършва свързване на MCP-1, ако присъства в биологичния материал, към фиксираните върху гнездата на плаката антитела. След измиване на всички несвързани субстанции, се добавя второ поликлонално антитяло, насочено срещу MCP-1 и конюгирано с ензим. След инкубацията излишъкът от несвързани субстанции се измива. Ензимната реакция се осъществява посредством добавяне на субстрат и образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е правопропорционален на първоначалното количество MCP-1 в биологичната проба. Аналитична чувствителност на теста за детекция на MCP-1 по данни на производителя - 0.57- 10 pg/ml.

**Използвани реагенти, предоставени в кита:** 96-гнездова микротитърна плака, лиофилизиран стандарт, конюгат, разредител за стандарта RD6Q за серумни/плазмени проби, разредител за стандарта RD5L за проби от клетъчни супернатанти, разредител за

процедурата RD1-83, цветен реагент А и реагент В, миеш разтвор 25x концентриран, стоп разтвор, адхезивни ленти. **Използвана апаратура:** ELISA четец Stat fax 2100.

**Изпълнение на метода:** Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита.

**Работен протокол за извършване на метода:**

Предварителна подготовка на реагентите:

- Възстановяване на стандарта с 5 ml разредител за стандарта RD6Q. Получава се работна концентрация (сток) от 2000 pg/ml и така приготвеният стандарт е необходимо да престои поне 15 минути. Приготвят се падащи разреждания на стандарта с разредител за стандарт RD6P с концентрация: 31.3, 62.5, 125, 250, 500 и 1000 pg/ml. Разредителят за стандарта се използва като нулев стандарт.
- Приготвяне на миеш разтвор от 20 ml концентрат с 480 ml дестилирана вода за получаване на 500 ml работен миеш разтвор.
- Субстратният разтвор се приготвя 15 минути преди употреба чрез смесване на цветен реагент А и В.
- Пробите на пациентите се разреждат в разредител за стандарта RD6Q за серумни/плазмени проби 1:2 (250 µl проба + 250 µl дилуент).

Извършване на методиката:

1. 96-ямковата плака се накапва с по 50 µl от разредителя за процедурата RD1-83 във всяко гнездо.
2. В повторения се накапват по 200 µl от стандартите в следния ред 0, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 и 1000 pg/ml и пациентски проби. Плаката се покрива с адхезивно фолио и се инкубира за 2 часа на стайна температура.
3. Отстранява се течността от гнездата и плаката се измива 4 пъти с по 400 µl от разреждания измиващ разтвор.
4. Добавят се по 200 µl от ензимния конюгат към всяко гнездо. Покрива се с адхезивно фолио и се инкубира за 2 часа на стайна температура.
5. Отстранява се течността от гнездата и плаката се измива 4 пъти с по 400 µl от разреждания измиващ разтвор.
6. Добавят се по 200 µl от предварително приготвения субстратен разтвор към всяко гнездо. Плаката се инкубира за 30 минути на стайна температура на тъмно.
7. Стопиране на ензимната реакция с по 50 µl стопиращ разтвор във всяко гнездо.
8. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm.
9. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите.

**Интерпретация на резултатите:** Резултатите се отчетохме на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо се преизчислихме като концентрация на MCP-1 в тестваните проби в pg/ml, съгласно построената калибрационна крива. Концентрацията на пробите се преизчислихме като се умножихме по фактор на разреждане 2.

**Очаквани стойности при здрави индивиди:** Взехме предвид при анализа на получените резултати данните предоставени от производителите, че при тестване на кита в серум от здрави лица (жени и мъже) са установени нива средно 370 pg/ml (200 - 722 pg/ml).

### 3) Транзиторна еластография с FibroScan 402

Проведохме измервания с FibroScan 402, които покриха възприетите критерии за валидност - 10 валидни измервания на liver stiffness (LS) в една точка, успеваемост над 60% и процент на разсейване на резултатите  $\leq 30\%$ . Използвахме средната стойност от десетте измервания (median stiffness) в kPa [39]. Данните при ХХС посочват стойности на LS  $\geq 8.8$  kPa за F $\geq 2$ , LS  $\geq 9.6$  kPa за F $\geq 3$  и LS  $\geq 14.6$  kPa за F4 [Таблица12] [172], а според друг авторски колектив LS  $\geq 7.1$  kPa за F $\geq 2$ , LS  $\geq 9.5$  kPa - F $\geq 3$ , а LS  $\geq 12.5$  kPa - F4 със съответни стойности на чувствителност и специфичност[Таблица 13] [30, 31].

**Таблица 12. Прагови нива на LS при ХХС [172].**

Стадий на фиброза	F $\geq 2$	F $\geq 3$	F = 4
LS (kPa)	$\geq 8.8$	$\geq 9.6$	$\geq 14.6$
Чувствителност	0.56	0.86	0.86
Специфичност	0.91	0.85	0.96
Площ под ROC крива	0.79	0.91	0.97

**Таблица 13. Прагови нива на LS при ХХС [31].**

Стадий на фиброза	F $\geq 2$	F $\geq 3$	F = 4
LS (kPa)	$\geq 7.1$	$\geq 9.5$	$\geq 12.5$
Чувствителност	0.67	0.73	0.87
Специфичност	0.89	0.91	0.91
Площ под ROC крива	0.83	0.90	0.95

## Статистически анализ

Използвахме статистически пакет Statistical Package for the Social Sciences - SPSS версия 19. Получените резултати са оценени като статистически значими при нива на вероятност ( $p$ ) по-малки от 0.05. Приложихме следните статистически методи:

1. Дескриптивен анализ
2. Тестове на Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk за проверка за наличие на нормално разпределение на числовите данни в групите
  - Непараметрични тестове:
    - Mann-Whitney U test за групово сравнение в отсъствието на нормално разпределение на числовите данни
    - Paired Student's t-test и Wilcoxon signed-rank test за сравнение на данни от чифтни проби
    - Kendall's Tau-b и Spearman's rho за непараметрични корелационни анализи
3. Хи-квадрат тест ( $\chi^2$ ) за сравнение на разпределение по категорийни признаци
4. Анализ на ROC крива за оценка на предиктивна стойност при сравнение на методи за неинвазивна оценка на чернодробната фиброза и стеатоза.
  - Съпоставка на площи под кривата (AUROC), чувствителност, специфичност
  - Изчисляване на положителен и отрицателен коефициент на вероятност
  - Изчисляване на позитивна (ППС) и негативна (НПС) предсказваща стойност

## VI. РЕЗУЛТАТИ

### **D) Серумните липиди при ХХС. Сравнителен анализ на нивата им с тези при НАСБ и връзка с чернодробното увреждане**

#### **1. Анализ на разпределението, сравнение на групови средни стойности и корелационен анализ**

Разпределението на числовите данни значително се различаваше от нормалното разпределение според анализа с тестовете на Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk. Това наложи използването на непараметрични тестове за сравнение между групите (Mann-Whitney U test) и корелационен анализ (Spearman's rho). Използвахме Хи-квадрат ( $\chi^2$ ) за тестване на разпределението по категории.

Стадият на чернодробна фиброза анализирахме като ординална променлива и като категориен признак - четири нарастващи по тежест стадии от F1 до F4 и групирани стадии на чернодробна фиброза (липса или наличие на сигнификантна или по-тежка чернодробна фиброза - F1 сравнени с F2-F4; липса или наличие на напреднала чернодробна фиброза - F1-F2 сравнени с F3-F4; липса или наличие на чернодробна цироза - F1-F3 сравнени с F4). Чернодробната стеатоза анализирахме като категориен признак (липса или наличие на стеатоза) и като числова променлива (хистологичен процент на хепатоцити с липидни отлагания). Предиабет и ЗДТ2 обединихме и анализирахме в една категория (наличие или липса).

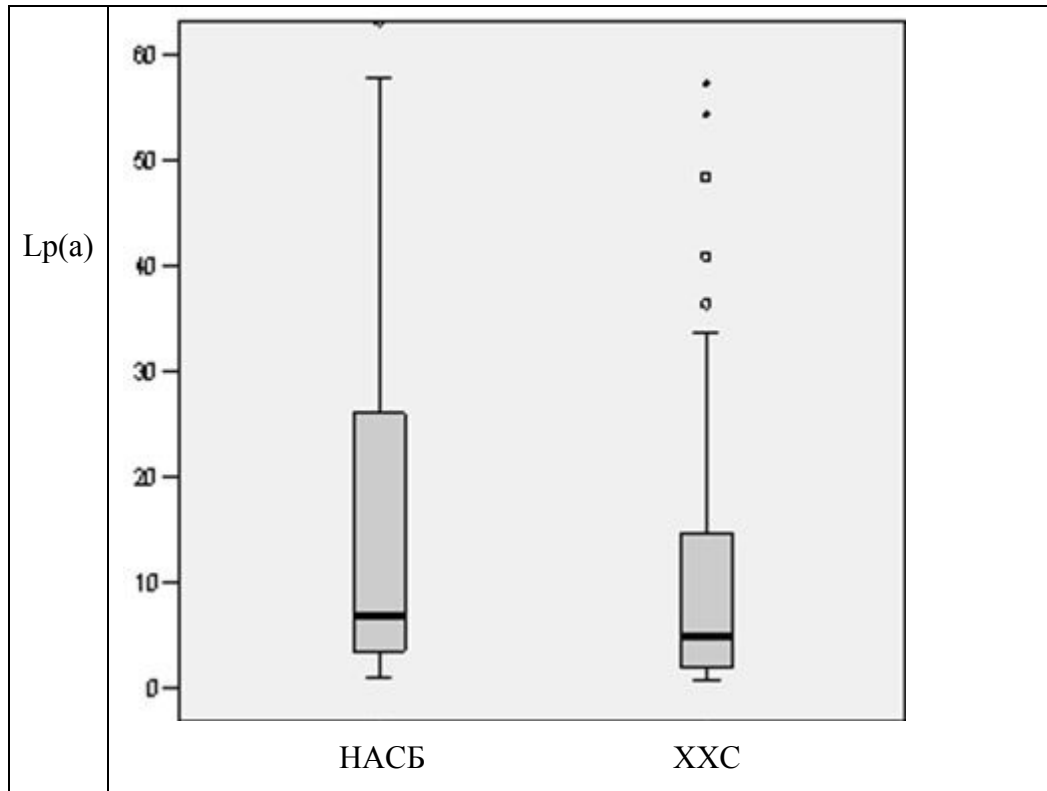
#### **2. Липопротеин (а) при ХХС и НАСБ**

Намерихме повишени серумни нива на Lp (а) при 17 от 112 пациенти с ХХС (15%) и при 19 от 80 пациенти с НАСБ (24%).

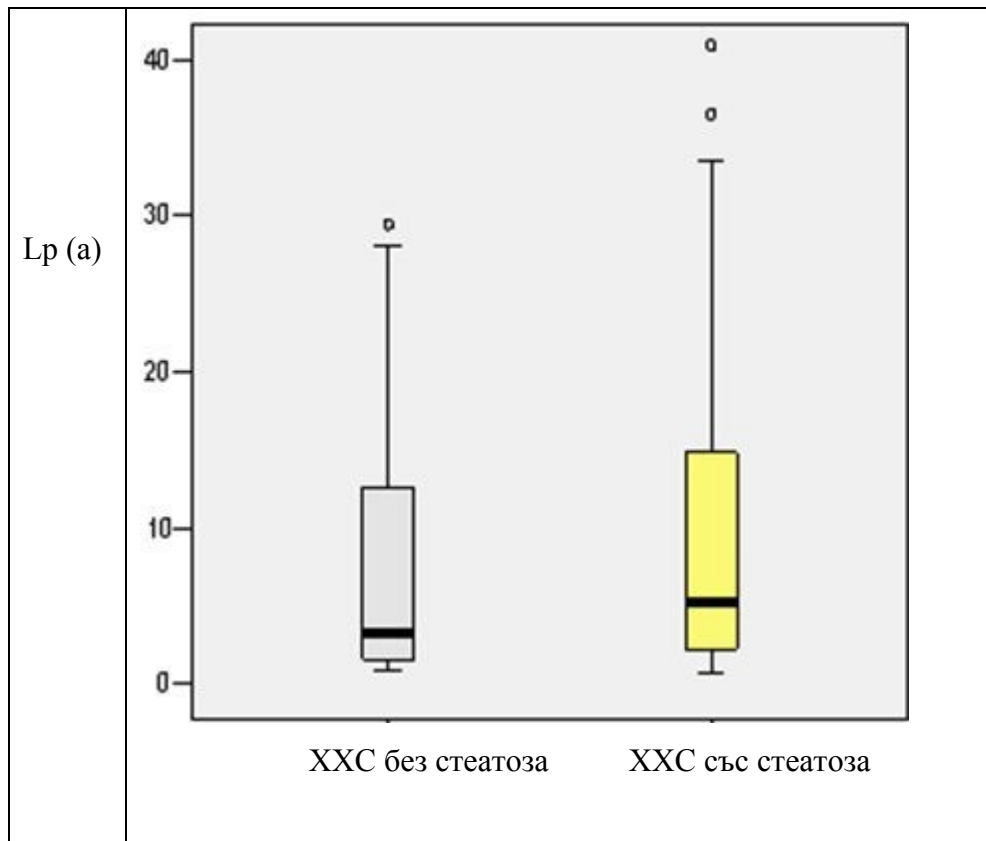
Средните серумни нива на Lp (а) бяха по-високи при НАСБ, отколкото при ХХС ( $p=0.016$ ), но нямаше разлика в средните серумни нива между пациентите с ХХС със стеатоза и тези без стеатоза [Фигура 1 и 2]. При пациентите с НАСБ и повишени серумен Lp(a), но не при тези ХХС и същото липидно нарушение, намерихме по-високи средни серумни нива и на LDL ( $p=0.036$ ) в сравнение с участниците, при които серумния Lp(a) беше нормален.

Повишените серумни нива на Lp (a) при НАСБ и ХХС не показаха връзка с възрастта, пола, наличието на затлъстяване, нарушена кръвна захар на гладно, артериална хипертония или наличието на метаболитен синдром при участниците.

**Фигура 1. Серумни нива на Lp (a) mg/dl при пациенти с НАСБ и ХХС.**



**Фигура 2. Серумни нива на Lp (a) mg/dl при пациенти с ХХС с и без стеатоза.**



Намерихме положителна корелация между серумните нива на Lp (a) и LDL при НАСБ ( $r=0.430$ ,  $p<0.001$ ). Положителна беше корелация на серумните нива на Lp(a) със нивата на общ холестерол и LDL и при ХХС със стеатоза ( $r=0.292$ ,  $p=0.021$ ). По-слаба, но все още значима корелация намерихме между серумните нива на Lp(a) и сбора от всички липопротеини с по-ниска плътност от тази на HDL (Non-HDL) ( $r=0.200$ ,  $p=0.048$ ) при пациенти с ХХС със стеатоза.

От пациенти с ХХС със стеатоза, отделно анализирахме само пациентите инфектирани с генотип 1. Намерихме корелация на тромбоцитния брой със серумните нива на Lp(a) ( $r=0.307$ ,  $p=0.002$ ). Корелацията между серумните нива на Lp(a) и наличието на F4 стадий на чернодробна фиброза беше обратна ( $r=-0.211$ ,  $p=0.037$ ) за същата подгрупа. Обратна корелация имаше и между серумните нива на Lp(a) и стойностите на скорове за неинвазивна оценка на фиброзата: FIB-4 скор ( $r=-0.293$ ,  $p=0.003$ ), APRI скор ( $r=-0.273$ ,  $p=0.006$ ) и Forns индекс ( $r=-0.325$ ,  $p=0.001$ ).

Не открихме значима корелация между серумните нива на Lp (a) и стадия на чернодробна фиброза, или неинвазивните скорове за оценка на фиброзата при пациентите с ХХС генотип 1, които нямаха стеатоза. Групата на пациенти с ХХС се отличаваше от тази на НАСБ по метаболитните фактори с по-благоприятни показатели на телесното тегло, по-малък процент на пациенти с метаболитен синдром и артериална хипертония. Неколкократно по-малко бяха пациентите с хиперлипидемия при ХХС, от тези при НАСБ. Дислипидемията с нисък HDL присъстваше еднакво в двете групи, но при пациентите с ХХС тя не беше свързана с хипертриглицеридемия, а беше проява на хипохолестеролемия [Таблица 14.]

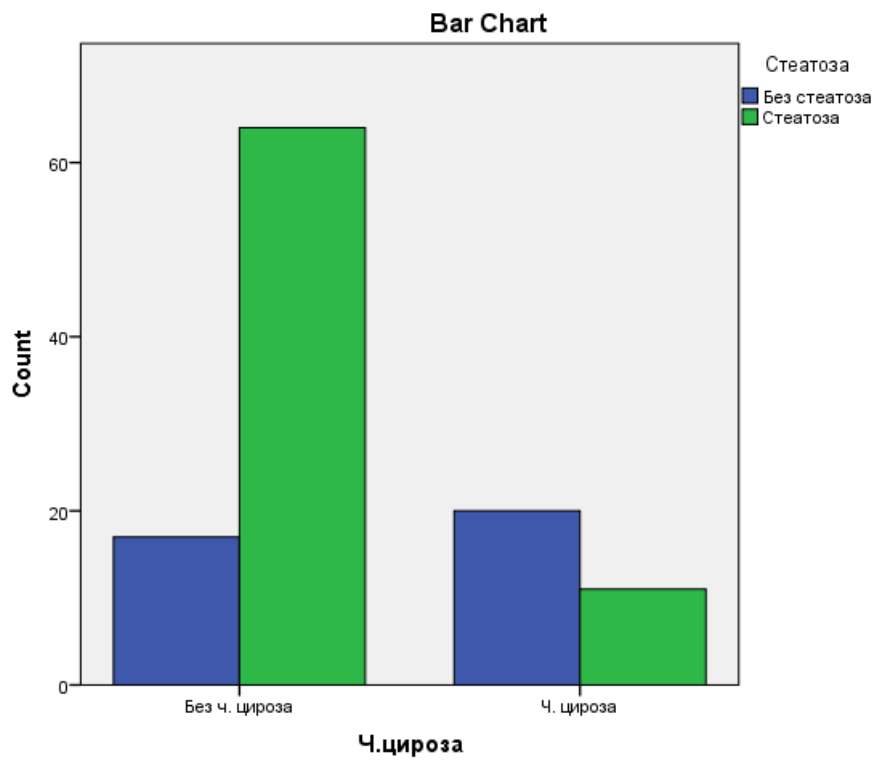
**Таблица 14. Процентни съотношения на метаболитните фактори в групите с НАСБ и ХХС.**

Метаболитни фактори	НАСБ (N=80)	ХХС (N=112)
Нормално телесно тегло	13 %	46.4 %
Наднормено тегло	41 %	37.5 %
Затлъстяване	46 %	16 %
Артериална хипертония	54 %	38 %
Глюкозни нарушения	47.5 %	39.3 %
Общ холестерол > 5 mmol/l	47 %	15.2 %
LDL > 3.5 mmol/l	42.5 %	7.1 %
Триглицериди > 1.7 mmol/l	30 %	3.6 %
HDL < 1.3 mmol/l жени HDL < 1.0 mmol/l мъже	30 %	31.2 %
Нарушени триглицериди и HDL	16 %	1 %
Триглицериди / HDL > 2	24 %	2.7 %
Метаболитен синдром	44 %	28.6 %

### **3. Нива на серумните липиди във връзка с характера и тежестта на чернодробното увреждане при ХХС**

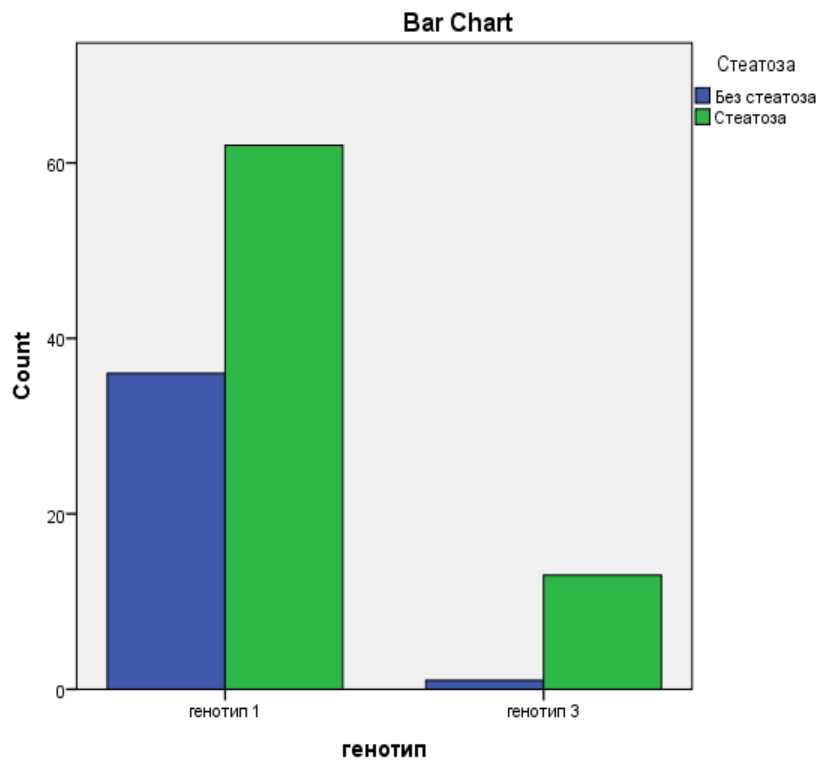
Разпределението на чернодробната стеатоза и фиброза не се припокриваха. Открихме в групата на пациенти със стеатоза повече случаи в стадий на напреднала (септална) фиброза (F3) и чернодробна цироза (F4) ( $p=0.006$ ). Сред пациентите с чернодробна цироза имаше по-малко случаи с чернодробна стеатоза ( $p<0.001$ ) – повечето такива бяха в групата на пациенти без чернодробна цироза (F1-F3) [Фигура 3].

**Фигура 3. Разпределение на стеатозата според наличието на чернодробна цирроза.**



Сравнихме пациентите с ХХС генотип 1 и генотип 3 намерихме по-ниска средната възраст ( $p < 0.001$ ), по-ниски серумни нива на триглицериди ( $p = 0.015$ ) и по-ниски средни стойности на вирусния товар ( $p = 0.006$ ). Честотата на чернодробната стеатоза намерихме по-висока ( $p = 0.028$ ) при пациентите с ХХС генотип 3 [Фигура 4].

**Фигура 4. Разпределение на стеатозата по генотип при пациенти с ХХС.**



В групата на пациенти с ХХС със стеатоза намерихме по-ниска средната възраст в сравнение с пациентите с ХХС без стеатоза ( $p < 0.001$ ). При пациентите с ХХС със стеатоза имаше по-високи нива на общ холестерол ( $p = 0.009$ ) и по-висок тромбоцитен брой ( $p < 0.001$ ). Наличието на стеатоза при ХХС корелираше със степента на некроинфламаторна активност при хистологично оценените пациенти ( $r = 0.320$ ,  $p < 0.001$ ). При анализ за неинвазивните фиброзни скорове намерихме обратна корелация между наличието на чернодробна стеатоза и стойностите на FIB-4 скор ( $r = -0.421$ ,  $p < 0.001$ ), APRI скор ( $r = -0.295$ ,  $p = 0.002$ ), Forns индекс ( $r = -0.452$ ,  $p < 0.001$ ), АСТ/АЛТ ( $r = -0.232$ ,  $p = 0.014$ ).

Разделихме и анализирахме отделно подгрупи според генотипа на HCV инфекцията и наличието на чернодробна стеатоза. При пациентите с ХХС без стеатоза намерихме обратна корелация между наличието на чернодробна цироза и серумните нива на LDL ( $r = -0.419$ ,  $p = 0.010$ ). Серумните нива на триглицериди и VLDL корелираха със стойностите на FIB-4 скор ( $r = 0.330$ ,  $p = 0.046$ ) и Forns индекс ( $r = 0.392$ ,  $p = 0.016$ ) в тази група.

При пациентите с ХХС с чернодробна стеатоза намерихме обратна корелация между стадия на фиброза и серумните нива на LDL ( $r = -0.281$ ,  $p = 0.015$ ). Серумните нива на триглицериди и VLDL корелираха със стойностите на FIB-4 скор ( $r = 0.280$ ,  $p = 0.015$ ) и Forns индекс ( $r = 0.319$ ,  $p = 0.005$ ).

Предвид противоположните знаци на корелациите на серумните нива на триглицериди, и LDL, с показатели оценяващи стадия на чернодробна фиброза изчислихме стойностите на съотношението между серумните нива на триглицериди и LDL. Означихме го като TG/LDL и тествахме корелацията му със стадия на чернодробна фиброза. Намерихме корелация между стойностите на TG/LDL и стадий на чернодробна цироза (F4) ( $r = 0.366$ ,  $p = 0.026$ ) при пациенти с ХХС без чернодробна стеатоза. Корелация имаше между TG/LDL и стадия на чернодробна фиброза ( $r = 0.419$ ,  $p < 0.001$ ) при пациентите с ХХС с чернодробна стеатоза.

При анализа на пациентите с ХХС генотип 1 намерихме по-високи средни серумни нива на общ холестерол ( $p = 0.002$ ) и LDL ( $p = 0.003$ ) при наличие на чернодробна стеатоза. При пациенти с ХХС генотип 1 независимо от наличието на стеатоза, при стадий на чернодробна цироза намерихме по-ниски средни серумни нива на общ холестерол ( $p < 0.001$ ), HDL ( $p = 0.018$ ) и LDL ( $p = 0.003$ ) в сравнение с тези нива при пациентите със стадия на цироза от F1 до F3 чернодробна фиброза. В същите подгрупи стойностите на TG/LDL ( $p = 0.001$ ) бяха по-високи при стадий на чернодробна цироза

(F4), отколкото при стадираните в по-нисък стадий на чернодробна цироза пациенти (F1-F3). Анализирахме тези пациенти според наличието на чернодробна стеатоза и получихме резултат за по-ниски средни серумни нива на общ холестерол ( $p < 0.001$ ) и LDL ( $p = 0.003$ ) при стадираните като чернодробна цироза (F4) отколкото при тези с по-нисък стадий на чернодробна фиброза (F1-F3), когато липсваше стеатоза. Когато беше налице чернодробна стеатоза по-ниски бяха средните серумните нива на HDL ( $p = 0.049$ ) при чернодробна цироза (F4), отколкото при пациенти с чернодробна фиброза в по-нисък стадий. Средните стойности на TG/LDL бяха по-високи при пациенти с чернодробна цироза (F4) отколкото при тези с по-нисък стадий на фиброза (F1-F3), както при наличие ( $p = 0.024$ ), така и при липса ( $p = 0.001$ ) на чернодробна стеатоза.

Намерихме корелация между стадий на чернодробна цироза (F4) и серумните нива на LDL ( $r = -0.417$ ,  $p = 0.011$ ), и стойностите на TG/LDL ( $r = 0.387$ ,  $p = 0.020$ ) при анализа на пациентите с ХХС генотип 1 без стеатоза. Серумните нива на TG и VLDL корелираха със стойностите на FIB-4 скор ( $r = 0.364$ ,  $p = 0.029$ ), APRI скор ( $r = 0.333$ ,  $p = 0.047$ ) и Forns индекс ( $r = 0.423$ ,  $p = 0.010$ ) в тази подгрупа. Степента на некроинфламаторна активност при хистологично оценените пациенти беше в обратна корелация със серумните нива на общ холестерол ( $r = 0.452$ ,  $p = 0.006$ ).

При пациентите с ХХС генотип 1 със стеатоза, корелацията между стадия на чернодробна фиброза и серумните нива на LDL се загуби, но корелацията между стойностите на TG/LDL и стадий на чернодробна цироза (F4) се запази ( $r = 0.315$ ,  $p = 0.010$ ). Серумните нива на триглицериди и VLDL корелираха със стойностите на Forns индекс ( $r = 0.261$ ,  $p = 0.040$ ) в тази подгрупа.

Тествахме стойностите на вирусния товар за корелация със серумните нива на липидните показатели при пациенти с ХХС генотип 1. Намерихме значима корелация между стойността на вирусния товар и серумните нива на триглицериди и VLDL ( $r = 0.330$ ,  $p = 0.009$ ) при пациентите със чернодробна стеатоза. Подобна корелация липсваше при тези без стеатоза.

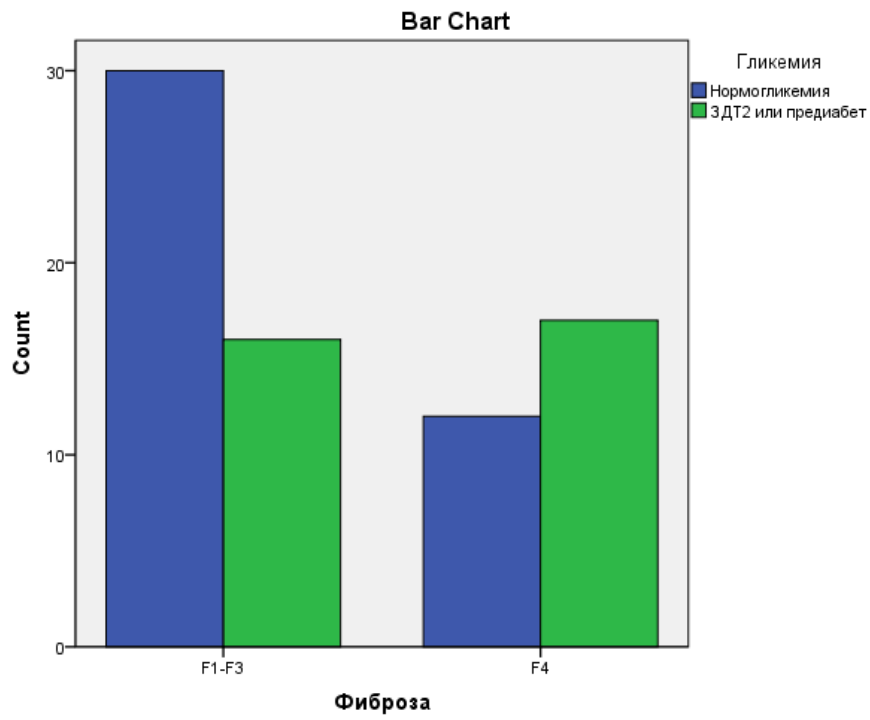
Резултатите при корелационния анализ на пациентите с ХХС генотип 3 не следваха същите зависимости, както тези с при пациенти с ХХС генотип 1. Малък брой корелации достигнаха статистическа значимост. Стадият на чернодробна фиброза показва обратна корелация със серумните нива на общ холестерол ( $r = -0.607$ ,  $p = 0.021$ ) и LDL ( $r = -0.625$ ,  $p = 0.017$ ). Степента на некроинфламаторна активност при хистологично оценените пациенти беше в обратна корелация със серумните нива на общ холестерол ( $r = -0.619$ ,  $p = 0.018$ ) и HDL ( $r = -0.686$ ,  $p = 0.007$ ). Резултатите за корелация на серумните

липидни нива с показатели на чернодробното увреждане не бяха подкрепени от значима разлика при сравнение на средните стойности при пациенти със и без чернодробна цироза. Намерихме корелация между стойността на вирусния товар и количествената оценка на чернодробната стеатоза като хистологичен процент на хепатоцити с липидни отлагания ( $r=0.585$ ,  $p=0.028$ ). Вирусният товар не корелираше с никое от серумните липидни нива. Чернодробна стеатоза имаха 13 от 14 участници в тази група, което не позволи да се разглежда в частност ХХС генотип 3 без стеатоза.

#### **4. Метаболитните фактори във връзка с характера и тежестта на чернодробното увреждане при ХХС генотип 1 и 3**

Случаите на глюкозните нарушения при пациентите с ХХС генотип 1 бяха равномерно разпределени между пациентите със чернодробна стеатоза независимо от стадия на фиброза или наличието на чернодробна цироза (F4). Случаите на ЗДТ2 и предиабет бяха повече сред пациентите в с ХХС в стадий на чернодробна цироза (F4) ( $p=0.043$ ) в сравнение с групата на пациенти с по-нисък стадий на чернодробна фиброза (F1-F3) [Фигура 5].

**Фигура 5. Разпределение на случаите със ЗДТ2 и предиабет между пациентите с ХХС генотип 1 със и без чернодробна цирроза.**



При пациентите с ХХС генотип 1 със стеатоза, при сравнение между различни стадии на чернодробна фиброза, в групата със стадий на чернодробна цироза (F4) средната възраст ( $p < 0.001$ ), средните стойности на глюкозата ( $p = 0.023$ ), ИТМ ( $p = 0.050$ ) и коремна обиколка ( $p = 0.006$ ) бяха по-високи, в сравнение с групата пациенти с по-нисък стадий на чернодробна фиброза (F1-F3).

При ХХС генотип 1, сред пациентите с данни за глюкозни нарушения (ЗДТ2 или предиабет), намерихме по-ниски средни серумни нива на общ холестерол ( $p < 0.001$ ), LDL ( $p = 0.004$ ) и HDL ( $p = 0.001$ ), при сравнението им с пациентите с нормогликемия. При наличие на ЗДТ2 или предиабет бяха по-високи средните стойности на TG/LDL ( $p < 0.001$ ) и средните стойности на някои лабораторни показатели за чернодробно увреждане и чернодробна фиброза: FIB-4 скор ( $p = 0.007$ ), APRI скор ( $p = 0.001$ ), АСТ ( $p = 0.005$ ), АЛТ ( $p = 0.012$ ), в сравнение с групата от пациенти без глюкозни нарушения. Честотата на глюкозни нарушения в групата на пациенти с ХХС генотип 3 беше ниска – един пациент със ЗДТ2 и един с НГТ.

Наличието на ЗДТ2 или предиабет, без оглед на генотип и наличие на чернодробна стеатоза, корелираше със стадия на фиброза ( $r = 0.257$ ,  $p = 0.011$ ), стойността на Forns индекс ( $r = 0.327$ ,  $p = 0.001$ ), серумните нива на триглицериди и VLDL ( $r = 0.241$ ,  $p = 0.017$ ), и беше в обратна корелация със серумните нива на общ холестерол ( $r = -0.299$ ,  $p = 0.003$ ) и HDL ( $r = -0.334$ ,  $p = 0.001$ ). При разделянето на пациентите според наличието на стеатоза, корелацията на ЗДТ2 и предиабет със серумните нива на триглицериди и VLDL ( $r = 0.524$ ,  $p = 0.001$ ) и със стадий на чернодробна цироза (F4) ( $r = 0.346$ ,  $p = 0.039$ ) се запази при пациентите без стеатоза и се изгуби при тези със стеатоза.

Консумацията на до 40 g абсолютен алкохол дневно при 9% от участниците в проучването не беше определяща за честотата на чернодробна стеатоза в групата. Метаболитните фактори присъстваха в анализите на всички подгрупи и показваха връзки помежду си, както и с показатели на чернодробното увреждане [Таблица 15,16,17,18 а,б]

При пациентите с ХХС генотип 3 нивата на пикочна киселина корелираха с ИТМ ( $r = 0.626$ ,  $p = 0.017$ ), коремната обиколка ( $r = 0.65$ ,  $p = 0.012$ ) и серумните нива на триглицериди и VLDL ( $r = 0.638$ ,  $p = 0.014$ ). От липидните показатели отрицателна беше корелацията на HDL с нивата на пикочна киселина ( $r = -0.563$ ,  $p = 0.036$ ). [Таблица 15]

**Таблица 15. Корелации между липидни нива и метаболитни фактори при пациенти с ХХС генотип 3.**

ХХС генотип 3	HDL	ТГ и VLDL	Коремна обиколка	ИТМ
Пикочна киселина	r= -0.563 p=0.036	r=0.638 p=0.014	r=0.651 p=0.012	r=0.626 p=0.017

Наличието на метаболитен синдром беше в корелация със стойностите на АЛТ (r=0.557, p=0.037). Серумните нива на триглицериди и VLDL корелираха със стойностите на серумен инсулин (r=0.673, p=0.008) и НОМА-IR (r=0.695, p=0.006). Стойностите на инсулина корелираха и с размера на коремната обиколка (r=0.541, p=0.046) [Таблица 16].

**Таблица 16. Корелации между липидни нива, метаболитни фактори и показатели на чернодробно увреждане при пациенти с ХХС генотип 3.**

ХХС генотип 3	ТГ и VLDL	Коремна обиколка	АЛТ
Инсулин	r=0.673 p=0.008	r=0.541 p=0.046	НС
НОМА-IR	r=0.695 p=0.006	НС	НС
Метаболитен синдром	НС	НС	r=0.557 p=0.037

При пациентите с ХХС генотип 1 от корелационния анализ в резултатите при пациентите с чернодробна стеатоза показаха различия спрямо тези при пациентите без стеатоза.

При пациентите с ХХС генотип 1 без стеатоза, стойностите на глюкозата корелираха както с показатели на чернодробното увреждане – стадий на фиброза (r=0.517, p<0.001) и Forns индекс (r=0.464, p=0.004), така и с други белези на метаболитния синдром – HDL (r= -0.410, p=0.001), ИТМ (r=0.325, p=0.015) и коремна обиколка (r=0.532, p=0.001). Отрицателна беше корелацията на плазмената глюкоза със серумните нива на общ холестерол (r= -0.520, p<0.001). Нивата на HDL бяха в обратна

корелационна зависимост с коремната обиколка ( $r = -0.438$ ,  $p = 0.008$ ), а стойностите на пикочната киселина корелираха с тези на серумния инсулин ( $r = 0.518$ ,  $p = 0.001$ ). От лабораторните неинвазивни скорове единствено Forns индекс корелираше с наличието на метаболитен синдром ( $r = 0.420$ ,  $p = 0.011$ ) [Таблица 17].

**Таблица 17. Корелации между липидни нива, метаболитни фактори и показатели на чернодробно увреждане при пациенти с ХХС генотип 1 без стеатоза.**

ХХС генотип 1 без стеатоза	Стадий на фиброза (F)	Forns индекс	HDL	Общ холестерол	Коремна обиколка	ИТМ	Пикочна киселина
Глюкоза	$r = 0.517$ $p < 0.001$	$r = 0.464$ $p = 0.004$	$r = -0.410$ $p = 0.001$	$r = -0.520$ $p < 0.001$	$r = 0.532$ $p = 0.001$	$r = 0.325$ $p = 0.015$	НС
Коремна обиколка	НС	НС	$r = -0.438$ $p = 0.008$	НС	-	НС	НС
Инсулин	НС	НС	НС	НС	НС	НС	$r = 0.518$ $p = 0.001$
Метаболитен синдром	НС	$r = 0.420$ $p = 0.011$	НС	НС	НС	НС	НС

При пациентите с ХХС генотип 1 със стеатоза нивата на плазмена глюкоза значително корелираха с показатели на чернодробното увреждане – стадия на чернодробна фиброза ( $r = 0.326$ ,  $p = 0.004$ ), стойностите на Forns индекс ( $r = 0.417$ ,  $p = 0.001$ ), скоровете APRI ( $r = 0.377$ ,  $p = 0.003$ ) и FIB-4 ( $r = 0.374$ ,  $p = 0.003$ ), както и стойностите на АСТ ( $r = 0.409$ ,  $p = 0.015$ ). От липидните показатели HDL беше в обратна корелация с плазмената глюкоза ( $r = -0.343$ ,  $p = 0.006$ ). Коремната обиколка корелираше с активността на АСТ ( $r = 0.336$ ,  $p = 0.008$ ) и АЛТ ( $r = 0.265$ ,  $p = 0.038$ ). Наличието на метаболитен синдром корелираше със стойностите на скоровете APRI ( $r = 0.399$ ,  $p = 0.001$ ), FIB-4 ( $r = 0.325$ ,  $p = 0.010$ ), Forns индекс ( $r = 0.357$ ,  $p = 0.004$ ), активността на АСТ ( $r = 0.436$ ,  $p < 0.001$ ) и АЛТ ( $r = 0.351$ ,  $p = 0.005$ ). ИТМ корелираше отрицателно с нивата на HDL ( $r = -0.259$ ,  $p = 0.042$ ) и положително със скоровете APRI ( $r = 0.345$ ,  $p = 0.006$ ), FIB-4 ( $r = 0.288$ ,  $p = 0.023$ ), Forns индекс ( $r = 0.347$ ,  $p = 0.006$ ), и стойностите на АСТ ( $r = 0.291$ ,  $p = 0.002$ ). Нивата на пикочна киселина показаха корелационна връзка със стадия на чернодробна фиброза ( $r = 0.284$ ,  $p = 0.025$ ), стойностите на НОМА-IR ( $r = 0.525$ ,  $p < 0.001$ ) и серумния инсулин ( $r = 0.520$ ,  $p = 0.001$ ). Корелацията беше обратна между нивата на HDL и активността на АЛТ ( $r = -0.294$ ,  $p = 0.020$ ), и с тези на пикочната киселина ( $r = -0.282$ ,

p=0.026). Стойностите на пикочна киселина бяха в обратна корелация и с нивата на общ холестерол ( $r = -0.309$ ,  $p=0.015$ ). ИТМ беше корелираше със стойностите на серумния инсулин ( $r=0.309$ ,  $p=0.015$ ) и НОМА-IR(  $r=0.299$ ,  $p=0.018$ ), и беше в обратна корелация с HDL ( $r= -0.259$ ,  $p=0.042$ ) [Таблица 18 а,б].

**Таблица 18. Корелации между липидни нива, метаболитни фактори и показатели на чернодробно увреждане при пациенти с ХХС генотип 1 със стеатоза.**

а)

ХХС генотип 1 със стеатоза	Стадий на фиброза (F)	Forns индекс	FIB-4	APRI	АСТ	АЛТ
Глюкоза	$r=0.326$ $p=0.004$	$r=0.417$ $p=0.001$	$r=0.374$ $p=0.003$	$r=0.377$ $p=0.003$	$r=0.409$ $p=0.015$	НС
Коремна обиколка	НС	НС	НС	НС	$r=0.336$ $p=0.008$	$r=0.265$ $p=0.038$
Метаболитен синдром	НС	$r=0.357$ $p=0.004$	$r=0.325$ $p=0.010$	$r=0.399$ $p=0.001$	$r=0.436$ $p<0.001$	$r=0.351$ $p=0.005$
ИТМ	НС	$r=0.347$ $p=0.006$	$r=0.288$ $p=0.023$	$r=0.345$ $p=0.006$	$r=0.291$ $p=0.002$	НС
Пикочна киселина	$r=0.284$ $p=0.025$	НС	НС	НС	НС	НС
HDL	НС	НС	НС	НС	НС	$r= -0.294$ $p=0.020$

б)

ХХС генотип 1 със стеатоза	HDL	Общ холестерол	ИТМ	Пикочна киселина
Глюкоза	r= -0.343 p=0.006	НС	НС	НС
Коремна обиколка	r= -0.343 p=0.006	НС	НС	НС
Инсулин	НС	НС	r=0.309 p=0.015	r= 0.520 p=0.001
НОМА-IR	НС	НС	r=0.299 p=0.018	r=0.525 p<0.001
ИТМ	r= -0.259 p=0.042	НС	-	НС
Пикочна киселина	r= -0.282 p=0.026	r= -0.309 p=0.015	НС	-

## II) Серумни липидни нива в оценката на чернодробното увреждане при ХХС

Серумното ниво на общ холестерол и тромбоцитния брой показаха най-достоверна и значима връзка с оценката на чернодробната стеатоза при ХХС в корелационния анализ и при сравнение на средни стойности в групите. Съотношението между серумните нива на триглицеридите и LDL показва връзка със стадия на чернодробна фиброза и най-достоверно с стадия на чернодробна цироза (F4). Проведохме анализ на ROC кривите на тези показатели, за да проучим способността им за разграничаване на чернодробно увреждане с различен характер и тежест на при пациенти с ХХС. В анализа включихме нивото на общ холестерол и тромбоцитния брой за предсказване наличието на чернодробна стеатоза. Стойностите на TG/LDL анализирахме за предсказване на стадий на напреднала чернодробна фиброза (F $\geq$ 3) и стадий на чернодробна цироза (F4).

Успоредно със стойностите на TG/LDL, анализирахме и стойностите на FIB-4 скор, Forns индекс, APRI скор и АСТ/АЛТ, за да ги съпоставим (Фигура 7-9; Таблица 20 а,б,в,г,д). За целите на анализа на ROC крива сведохме стадиите на фиброза до две

групи за сравнение, обединяващи случаи с последователни стадии на фиброза от класификацията METAVIR. В единия анализ целяхме да разграничим стадия на чернодробна цироза (F4) от всички по-ниски стадии на фиброза от начална до тежка септална фиброза без цироза (F1, F2, F3) според скорвата система METAVIR. Във втория анализ целяхме да разграничим стадия на напреднала чернодробна фиброза  $F \geq 3$  (обединени стадията на тежка септална фиброза – F3 и чернодробна цироза – F4). Ефектите на чернодробната стеатоза и чернодробната цироза върху серумните нива на общ холестерол и LDL бяха разнопосочни. Поради това и поради различната честота на чернодробната стеатоза при ХХС генотип 3, разделихме анализа според наличието на стеатоза и според генотипа на ХХС.

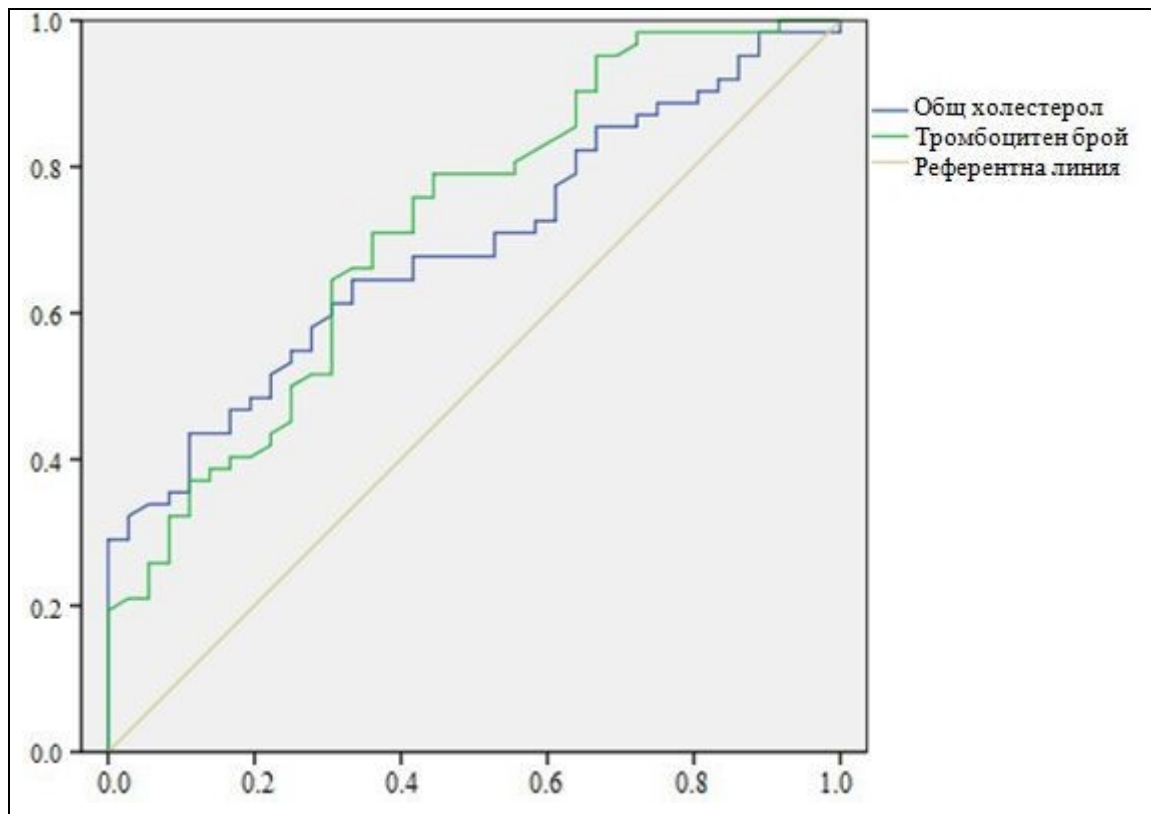
### 1. Анализ на ROC крива за показатели предсказващи наличието на чернодробна стеатоза при ХХС

Намерихме площ под ROC кривата (AUROC) – 0.719 за тромбоцитния брой в предсказване на наличието на чернодробна стеатоза, с ниво на значимост ( $p < 0.001$ ). За нивата на общ холестерол AUROC достигна 0.652, с ниво на значимост ( $p = 0.009$ ), без оглед на HCV генотипа. Проведохме анализ в групата пациенти с ХХС генотип 1 и резултатите за площ под кривата на тромбоцитния брой достигнаха AUROC 0.719 ( $p < 0.001$ ) и за нивото на общ холестерол AUROC 0.691 ( $p = 0.002$ ) [Фигура 6, Таблица 19].

**Таблица 19. AUROC на тромбоцитен брой и серумно ниво на общ холестерол за чернодробна стеатоза.**

	AUROC	
	Тромбоцитен брой	Общ холестерол
ХХС генотип 1 и 3	0.719 ( $p < 0.001$ )	0.652 ( $p = 0.009$ )
ХХС генотип 1	0.719 ( $p < 0.001$ )	0.691 ( $p = 0.002$ )

**Фигура 6. ROC криви на тромбоцитен брой и общ холестерол за чернодробна стеатоза при пациенти с ХХС генотип 1.**



Ордината: чувствителност

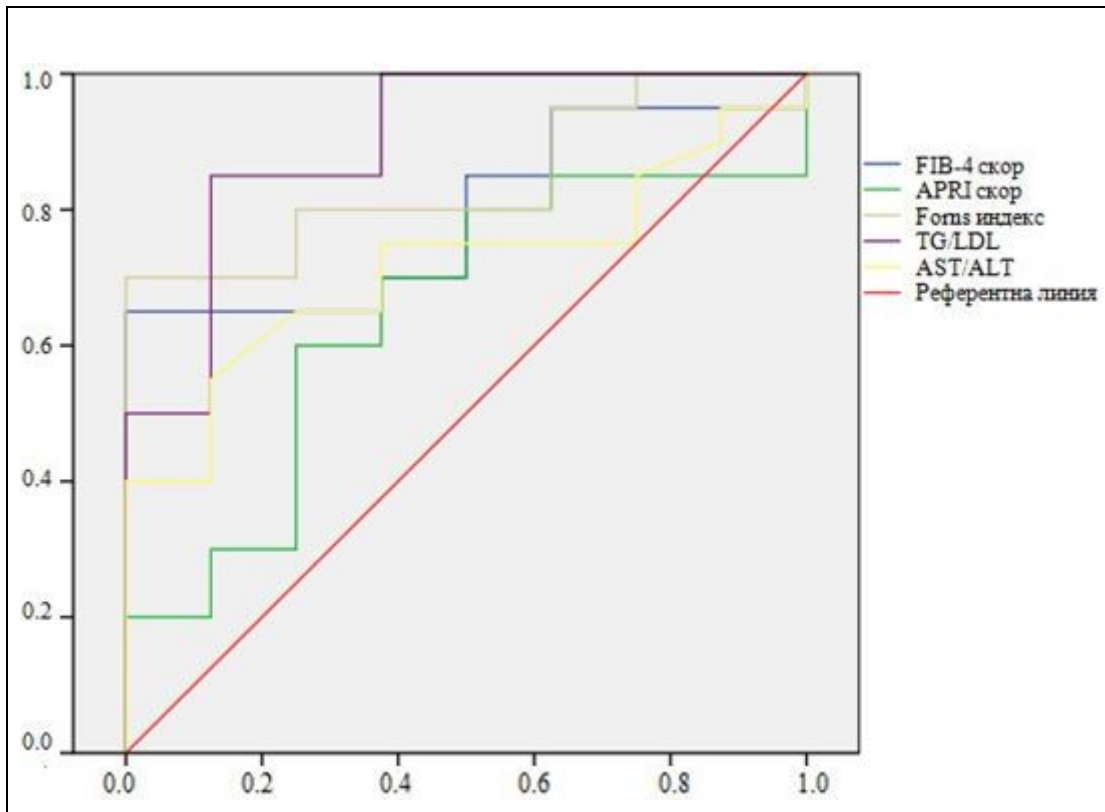
Абсциса: 1- специфичност

Диagonal: референтна линия

## **2. Анализ на ROC криви за показатели предсказващи стадия на чернодробна фиброза при ХХС**

За стойностите на TG/LDL при пациенти с ХХС без стеатоза, без оглед на генотипа, намерихме AUROC 0.856 с ниво на значимост ( $p=0.003$ ) в предсказване на наличието на чернодробна цироза (F4). Анализирахме групата пациенти с ХХС генотип 1, за които получихме резултат от AUROC 0.900, с ниво на значимост ( $p=0.001$ ) [Фигура 7, Таблица 20].

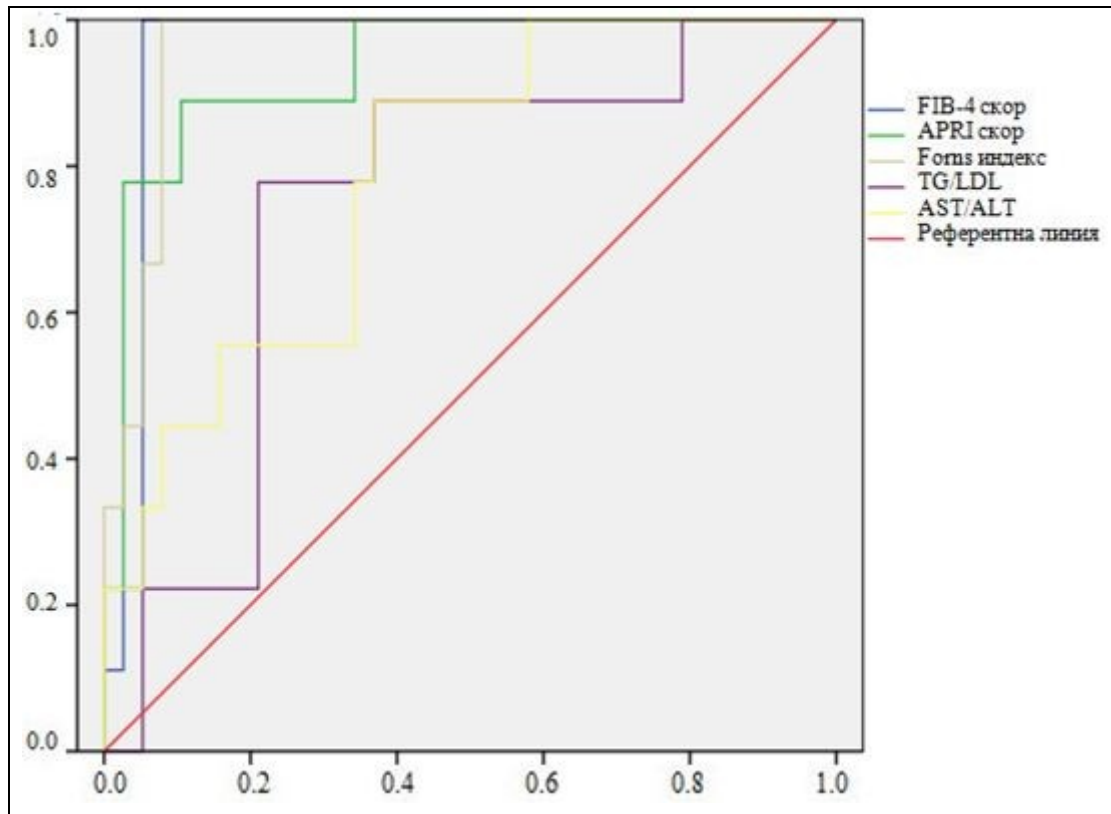
**Фигура 7. ROC криви на индиректни фиброзни скорове и TG/LDL за: ХХС генотип 1 в стадии на чернодробна цирроза (F4) без стеатоза.**



Ордината: чувствителност  
Абсциса: 1- специфичност  
Диagonal: референтна линия

За стойностите на TG/LDL при пациенти с ХХС със стеатоза, без оглед на генотипа, намерихме AUROC 0.722 , с ниво на значимост ( $p=0.023$  ) в предсказване на наличието на чернодробна цироза (F4). Анализирахме групата пациенти с ХХС генотип 1, за които получихме резултат от AUROC 0.743, с ниво на значимост ( $p=0.025$ ) [Фигура 8, Таблица 20].

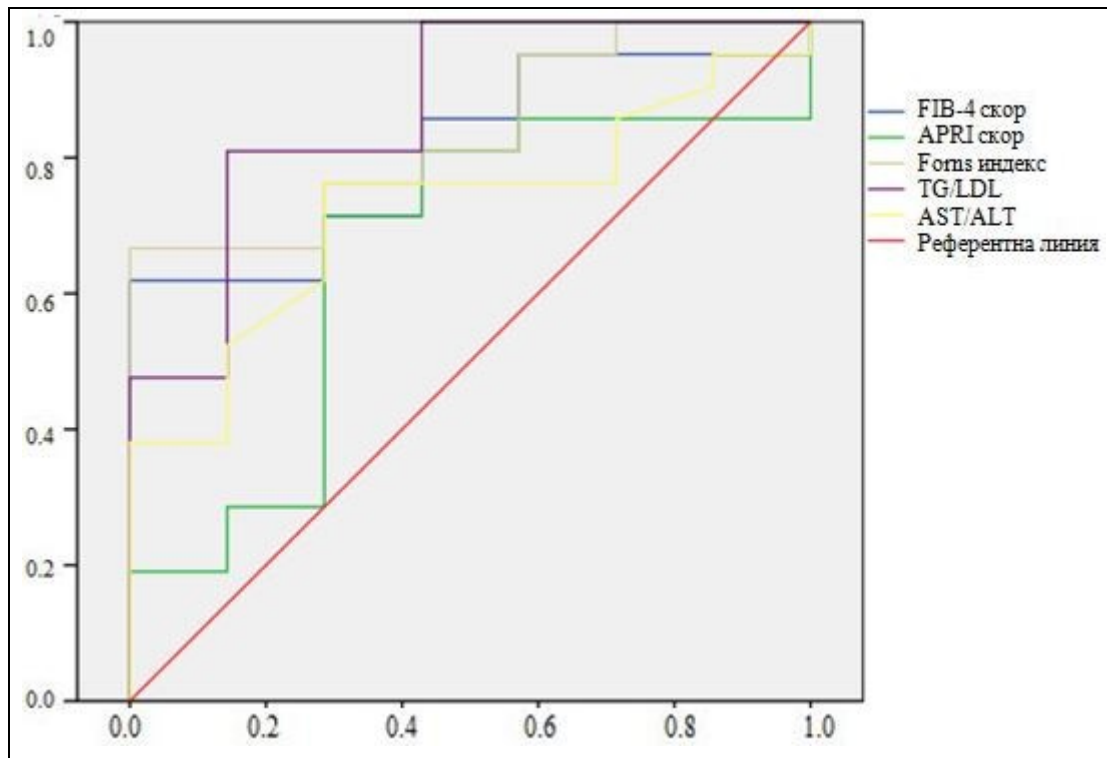
**Фигура 8. ROC криви на индиректни фиброзни скорове и TG/LDL за ХХС генотип 1 в стадии на чернодробна цирроза (F4) със стеатоза.**



Ордината: чувствителност  
Абсциса: 1- специфичност  
Диagonal: референтна линия

При пациенти с ХХС без стеатоза без оглед на генотипа, за стойностите на TG/LDL намерихме AUROC 0.821 с ниво на значимост ( $p=0.008$ ) в предсказване на наличието на напреднала чернодробна фиброза ( $F\geq 3$ ). Анализирахме групата пациенти с ХХС генотип 1, за които получихме резултат от AUROC 0.871, с ниво на значимост ( $p=0.004$ ) [Фигура 9, Таблица 20].

**Фигура 9. ROC криви на индиректни фиброзни скорове и TG/LDL за: ХХС генотип 1 в стадии на напреднала чернодробна фиброза и цирроза (F $\geq$ 3) без стеатоза.**



Ордината: чувствителност  
Абсциса: 1- специфичност  
Диagonal: референтна линия

**Таблица 20. AUROC на TG/LDL за стадий на напреднала чернодробна фиброза (F $\geq$ 3) и чернодробна цироза (F4) с и без стеатоза в група ХХС генотип 1 и 3, и в група ХХС генотип 1.**

TG/LDL	AUROC			
	F $\geq$ 3 без стеатоза	F $\geq$ 3 със стеатоза	F4 без стеатоза	F4 със стеатоза
ХХС генотип 1 и 3	0.821 (p=0.008)	0.610 НС	0.856 (p=0.003)	0.722 (p=0.023)
ХХС генотип 1	0.871 (p=0.004)	0.649 НС	0.900 (p=0.001)	0.743 (p=0.025)

Стойностите на TG/LDL при пациенти с ХХС със стеатоза за предсказане на напреднала чернодробна фиброза (F $\geq$ 3) не достигнаха ново на достоверност и значимост независимо от генотипа на инфекцията. Резултатите от отделния анализ на пациенти с ХХС генотип 3 не достигнаха нивото на достоверност и значимост.

Включихме в анализа на ROC криви успоредно и стойностите на неинвазивните скорове за оценка на чернодробната фиброза. Стойностите на APRI скор, Forns индекс, FIB-4 скор и АСТ/АЛТ анализирахме успоредно с тези на TG/LDL за стадията на напреднала чернодробна фиброза (F $\geq$ 3) и чернодробна цироза (F4) при пациенти с ХХС генотип 1 със и без стеатоза. Получените резултати съпоставихме с наличните за тях данни от сравнителни и валидиращи проучвания. Не открихме данни тези скорове разделящи резултатите за диагностичната стойност на тези скорове според наличието на чернодробна стеатоза от предшестващи проучвания [Фигура 7-9, Таблица 21 а,б,в,г,д][6, 77, 90, 156].

**Таблица 21. AUROC на неинвазивни скорове за оценка на чернодробната фиброза и при ХХС генотип 1 с и без стеатоза: а) APRI скор; б) Forns индекс; в) FIB-4 скор; г) АСТ/АЛТ .**

**а) APRI скор**

Авторски колектив	AUROC			
	F $\geq$ 3	F $\geq$ 3 със стеатоза	F4	F4 със стеатоза
Вълков и сътр.	0.653 НС	0.904 (p<0.001)	0.644 НС	0.936 (p<0.001)
Adler и сътр. [6]	0.886		0.915	
Martinez и сътр. [90]	0.860		0.860	
Li и сътр. [77]	0.826		0.810	

**б) Forns индекс**

Авторски колектив	AUROC			
	F $\geq$ 3	F $\geq$ 3 със стеатоза	F4	F4 със стеатоза
Вълков и сътр.	0.837 (p=0.009)	0.859 (p<0.001)	0.844 (p=0.005)	0.959 (p<0.001)
Adler и сътр. [6]	0.902		0.877	
Martinez и сътр. [90]	0.850		0.870	

**в) FIB-4 скор**

Авторски колектив	AUROC			
	F $\geq$ 3	F $\geq$ 3 със стеатоза	F4	F4 със стеатоза
Вълков и сътр.	0.810 (p=0.016)	0.924 (p<0.001)	0.794 (0.017)	0.956 (p<0.001)
Adler и сътр.[6]	0.898		0.925	
Martinez и сътр.[90]	0.870		0.890	
Li и сътр. [77]	0.854		0.860	

**г) АСТ/АЛТ**

Авторски колектив	AUROC			
	F $\geq$ 3	F $\geq$ 3 със стеатоза	F4	F4 със стеатоза
Вълков и сътр.	0.724 (нс)	0.698 (p=0.025)	0.716 (нс)	0.787 (p=0.008)
Li и сътр. [77]	0.667		0.716	

**3. Сравнителен анализ на представянето на TG/LDL и скорвете за  
неинвазивна оценка на чернодробната фиброза**

Площта под ROC кривата на TG/LDL достигна стойности съизмерими с тези на валидирани и използвани в практиката скорове за неинвазивна оценка на чернодробната фиброза. Анализирахме нивата на чувствителност и специфичност за избраните стойности на съотношението от ROC кривата. Използвахме стойностите на чувствителност и специфичност за изчисляването на положителен коефициент на вероятност [LR (+)], и отрицателен [LR (-)] коефициент на вероятност.

$$LR (+) = \frac{\text{чувствителност}}{1 - \text{специфичност}}$$

$$LR (-) = \frac{1 - \text{чувствителност}}{\text{специфичност}}$$

Позитивна (ППС) и негативна (НПС) предсказваща стойност получихме след изброяване на истинските и фалшивите резултати при прилагане на праговите стойности, и по формулите:

$$\text{ППС} = \frac{N \text{ истински позитивни резултати}}{N \text{ истински позитивни резултати} + N \text{ фалшиво позитивни резултати}}$$

$$\text{НПС} = \frac{N \text{ истински негативни резултати}}{N \text{ истински негативни резултати} + N \text{ фалшиво негативни резултати}}$$

При стойност на TG/LDL над 0.32 чувствителността на показателя за чернодробна цироза беше висок. LR (-) за чернодробна цироза беше най-нисък при липса на чернодробна стеатоза и 90% от случаите на чернодробна цироза (F4) имаха стойности на TG/LDL над 0.32. Кореспондиращата му НПС за чернодробна цироза беше значителна при стойности на TG/LDL под 0.32. Специфичността на TG/LDL за предсказане на наличието на напреднала чернодробна фиброза и цироза беше висока при стойности над 0.52 при липса на стеатоза. Съответно LR (+) за това състояние беше висок при TG/LDL над 0.52. При тези стойности чувствителността на показателя беше ниска и поради това ППС за чернодробна цироза беше недоволителна, когато не беше отчетено влиянието на стеатозата. Специфичността на TG/LDL при стойностите над 0.52 спадна до 76% за предсказването на чернодробна цироза при наличие на чернодробна стеатоза. LR (+) за чернодробна цироза при тези стойности при наличие на стеатоза съответно спадна до 3.25 [Таблица 22 и 23].

**Таблица 22. Прагови стойности, чувствителност, специфичност и коефициенти на вероятност за чернодробна цироза на TG/LDL за стадии на напреднала фиброза (F $\geq$ 3) и чернодробна цироза (F4) при ХХС генотип 1 със и без стеатоза.**

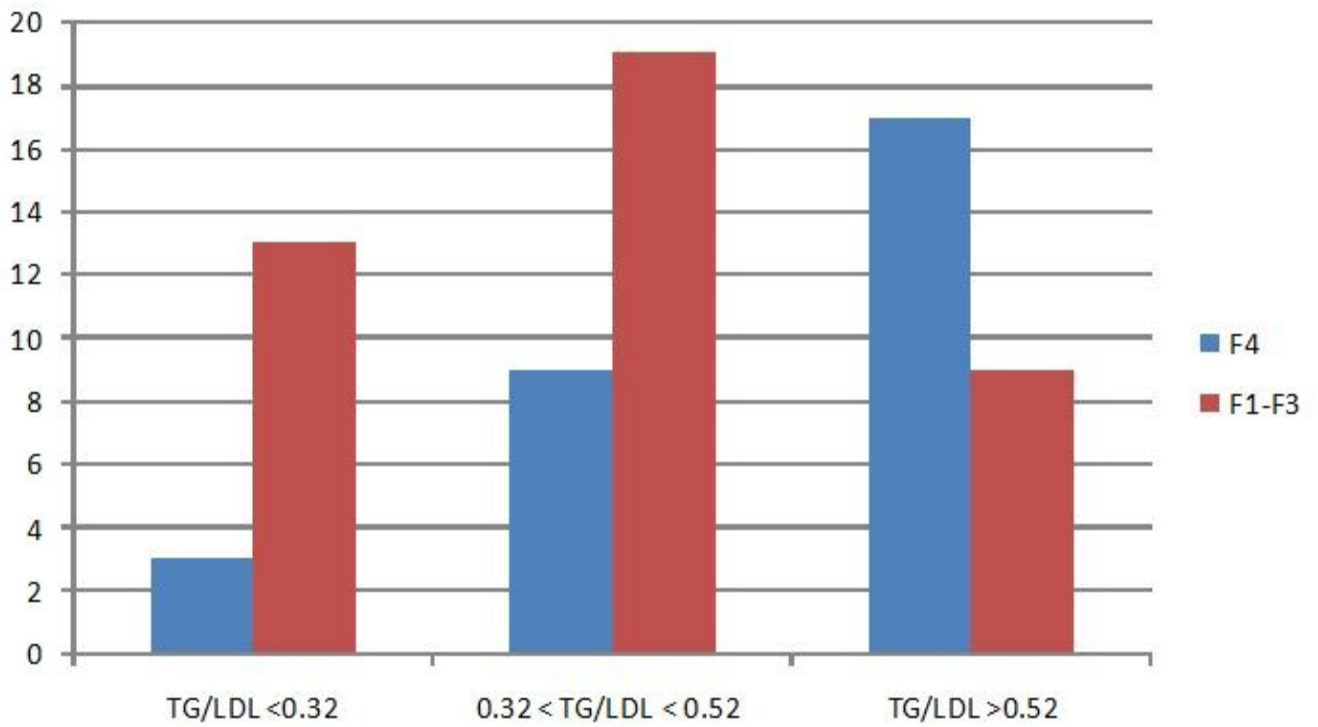
TG/LDL		Предсказан стадий на чернодробна фиброза с и без чернодробна стеатоза			
		F $\geq$ 3	F $\geq$ 3 със стеатоза	F4	F4 със стеатоза
0.32	Чувствителност	86 %	НС	90 %	89 %
	Специфичност	57 %		68 %	26 %
	LR (+)	2		2.57	1.2
	LR (-)	0.25		0.15	0.42
0.52	Чувствителност	66 %		50 %	78 %
	Специфичност	100 %		100 %	76 %
	LR (+)	66		50	3.25
	LR (-)	0.40		0.51	0.22

**Таблица 23. Предсказваща стойност на TG/LDL за F $\geq$ 3 и F4 при ХХС генотип 1.**

TG/LDL	Предсказващи стойности на TG/LDL			
	Прагово ниво	ППС	Прагово ниво	НПС
F $\geq$ 3	> 0.32	0.54	< 0.32	0.61
F4		0.46		0.83
F $\geq$ 3	> 0.52	0.68	< 0.52	0.59
F4		0.64		0.73

Праговите стойности на TG/LDL 0.32 и 0.52, независимо от наличието на чернодробна стеатоза, разделиха групата от пациенти с ХХС генотип 1 на три условни подгрупи, в които пропорционално нарастваше броя случаи с чернодробна цироза (F4). При стойности на TG/LDL над 0.52, случаите с чернодробна цироза са близо два пъти повече от тези с по-нисък стадий на чернодробна фиброза (F1-F3) [Фигура 10].

**Фигура 10. Брой на пациенти с ХХС генотип 1 в стадии F4 и F1-F3 спрямо праговите стойности на TG/LDL.**



Неинвазивните фиброзни скорове базирани на стойностите на серумна ензимна активност, тромбоцитен брой и възраст бяха в обратна корелация с наличието на чернодробна стеатоза. Диагностичната им стойност за чернодробна цироза при ХХС генотип 1 беше добра в присъствието на чернодробна стеатоза. Обратно при TG/LDL, диагностична стойност на съотношението за напреднала чернодробна фиброза и цироза намерихме по-ниска при наличие на чернодробна стеатоза. Допуснахме, че скоровете FIB-4 скор, APRI скор, Forns индекс, АСТ/АЛТ долавят случаи на чернодробна цироза, които са различни от тези, при TG/LDL над 0.52. За да проверим тази хипотеза, приложихме прагови стойности на FIB-4 скор  $\geq 5.88$  и на APRI скор  $\geq 2$ , в съответствие с литературните данни за диагностичната им стойност за чернодробна цироза, при нашата група пациенти с ХХС генотип 1. За Forns индекс не разполагахме с прагова стойност за стадий на чернодробна цироза. За АСТ/АЛТ приехме стойности  $\geq 1$  за долавяне на напреднала чернодробна фиброза ( $F \geq 3$ ) [77, 90]. Определихме стойността на TG/LDL  $\geq 0.52$  за прагова по отношение на стадий на чернодробна цироза (F4) при ХХС генотип 1.

От 29 случая на чернодробна цироза, 7 случая (25%) не бяха доловени от нито един скор или TG/LDL. Преброихме десет случая на чернодробна цироза (F4), които бяха доловени от TG/LDL, но пропуснати от FIB-4 скор и APRI скор. Шест случая на чернодробна цироза бяха доловени от FIB-4 скор или APRI скор, но пропуснати от TG/LDL. От тези случаи изброихме 5 доловени само от APRI скор. Събрани заедно, случаите на чернодробна цироза доловени от TG/LDL и APRI скор бяха 20 или 69% от всички случаи на чернодробна цироза (F4) в групата на ХХС генотип 1. Изброихме 5 случая на чернодробна цироза, които бяха едновременно доловени от TG/LDL и APRI скор. Стойност на TG/LDL по-голяма от 0.52 имаха 9 случая в стадий на чернодробна фиброза без цироза (F1-F3). Нито един от тях не беше погрешно определен в по-висок стадий на чернодробна фиброза от APRI скор. Изброихме три случая на чернодробна цироза (F4), които имаха стойности на TG/LDL по-малки от 0.32 и не бяха доловени като такива от нито един от използваните скорове. Чернодробна стеатоза имаше при 11 от 12 погрешно класирани от TG/LDL случаи. Повторихме анализа с прагова стойност на FIB-4 скор  $\geq 3.25$  за стадий на напреднала чернодробна фиброза и цироза ( $F \geq 3$ ). При тази стойност FIB-4 скорът долови 20 от общо 37 случая на напреднала чернодробна фиброза ( $F \geq 3$ ), но при по този начин 11 случая в стадий на чернодробна цироза (F4) със стойност на FIB-4 скор по-малка от 5.88 не бяха определени като такива.

Стойността на съотношението АСТ/АЛТ > 1 позволи да се определят 16 от 37 случая на напреднала чернодробна фиброза ( $F \geq 3$ ), но също без възможност да се различат от тях случаите в стадий на напреднала чернодробна фиброза без цироза (F3) от тези с чернодробна цироза F4. Forns индекс имаше значителна площ под ROC кривата. Поради липса на литературни данни за използването му при напреднала чернодробна фиброза и недефинирана за тези случаи прагова стойност не беше включен в този сравнителен анализ.

#### 4. Сравнение на транзиторната еластография с хистологичната оценка на чернодробната фиброза при пациенти с ХХС

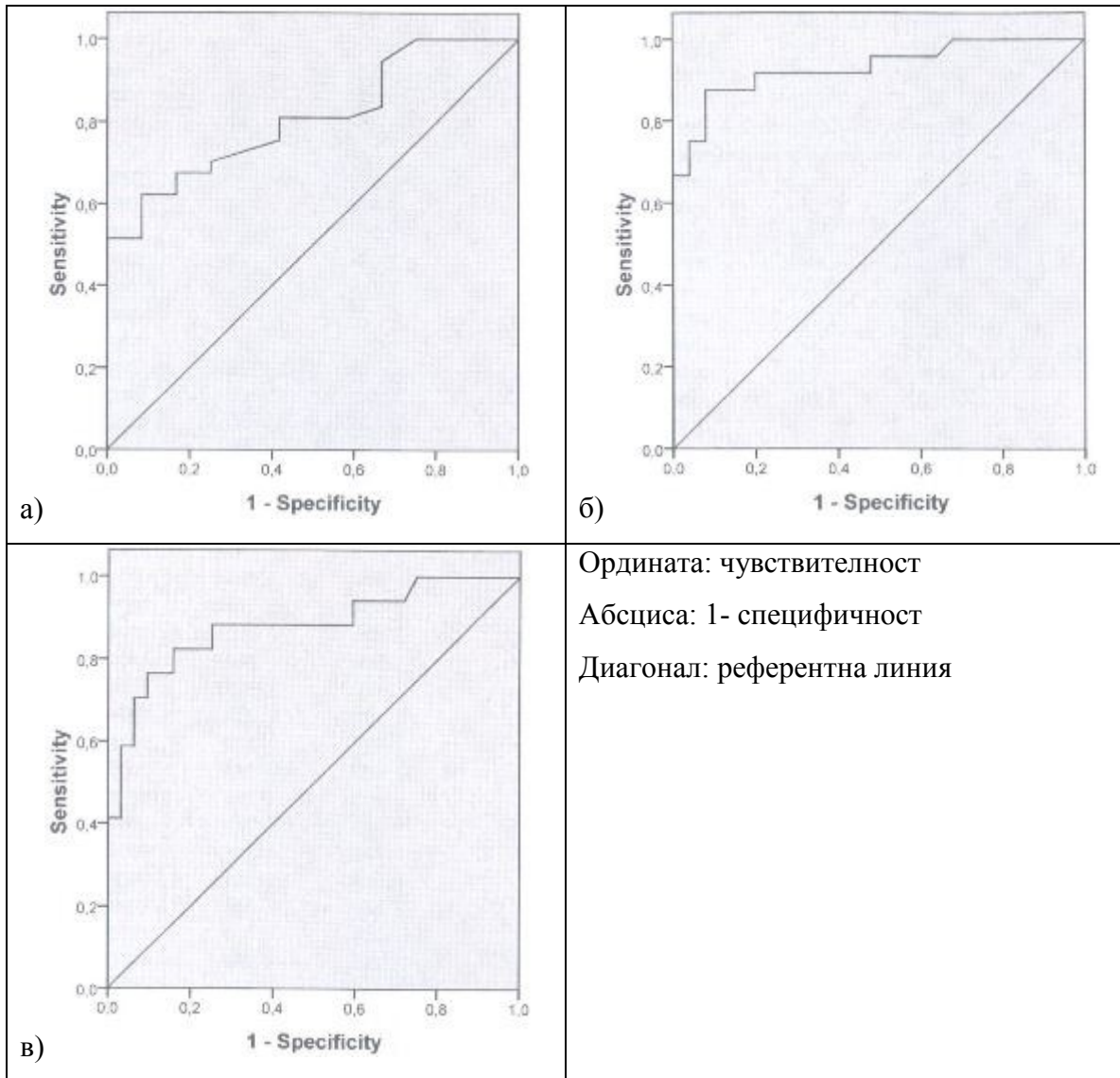
Представени бяха всички стадии от начална чернодробна фиброза до компенсирана чернодробна цироза. Получихме за групата средна стойност на LS  $11.32 \pm 10.19$  kPa [Таблица 24]. Проведохме корелационен анализ на стойностите от измерванията и данните за чернодробна фиброза оценена спрямо класификацията METAVIR при същите пациенти. Намерихме значима корелация ( $r=0.565$ ,  $p<0.001$ ) между измерените еластографски стойности на LS и оценения стадий на чернодробна фиброза.

**Таблица 24. Стойности на LS в kPa при пациенти с ХХС.**

Средна стойност	Стандартно отклонение	Максимум	Минимум	Корелация със стадия на фиброза	Значимост
11.32	10.19	49.60	3.20	$r=0.565$	$p<0.001$

Проведохме анализ на ROC крива за стойностите на LS, за да получим данни за прагови стойности на показателя, при които с точност може да бъде определен даден стадий на чернодробна фиброза. Въз основа на резултатите за нивата на чувствителност и специфичност достигнахме до три използвани стойности на LS за пациенти с ХХС. Стойност на  $LS \geq 12.3$  kPa определяше наличието на чернодробна цироза. При  $LS \geq 9$  kPa - напреднала фиброза  $F \geq 3$  и  $LS \geq 6.3$  kPa - значима фиброза  $F \geq 2$  с високо ниво на специфичност, задоволителни стойности на чувствителност и площ под ROC кривата [Таблица 25, Фигура 11 а, б, в].

**Фигура 11. ROC криви на LS за стади на фиброза F2(а), F3(б) и F4(в) при ХХС.**



**Таблица 25. Прагови нива на LS и предсказващата им стойност за стадия на чернодробна фиброза при ХХС.**

LS	F ≥ 2	F ≥ 3	F = 4
kPa	≥ 6.3	≥ 9	≥ 12.3
Чувствителност	0.68	0.75	0.71
Специфичност	0.83	0.96	0.94
Площ под ROC крива	0.81	0.93	0.88

Измерванията на LS показаха съвпадение с хистологичния стадий на фиброзата съответно 82% за F3-F4 и 63% за F1-F2, когато използвахме прагови нива на LS за ХХС от предложени от Castéra и сътр. [30,31]. Съпадението с хистологичния стадий на чернодробна фиброза беше 70% за F1-F2 и 88% за F3-F4 при прагови нива на LS за ХХС от Ziol и сътр. [172][Таблица 26].

**Таблица 26. Брой на съвпадения между еластографските измервания и хистологичната оценката на стадия на чернодробна фиброза при пациенти с ХХС.**

Ненапреднала фиброза F1-F2				
	Съвпадение	Транзиторна еластография	Хистология	По-висок стадий на фиброза
Castéra и сътр. [30,31].	N=20 (63%)	32	25	9
Ziol и сътр. [172]	N=23 (70%)	33	25	7
Напреднала фиброза F3-F4				
	Съвпадение	Транзиторна еластография	Хистология	По-нисък стадий на фиброза
Castéra и сътр. [30,31]	N=14 (82%)	17	24	3
Ziol и сътр. [172]	N=14 (88%)	16	24	2

### III) Резултати за серумните нива на МСР-1 преди и след противовирусна терапия

#### 1. Корелационен анализ на изходните показатели

Проведохме корелационен анализ на изходните показатели на 21 пациенти с ХХС генотип 1 и 3. Намерихме корелация между серумната концентрация на МСР-1 и стойностите на ИТМ в групата ( $r=0.522$ ,  $p=0.015$ ). Анализирахме стойностите в групите разделени според наличие на чернодробна стеатоза, напреднала чернодробна фиброза, метаболитен синдром, предиабет или ЗДТ2, наднормено тегло и затлъстяване. По-високи средни серумни концентрации на МСР-1 имаше при пациентите с наднормено тегло и затлъстяване в сравнение с групата, в която пациентите бяха с нормално телесно тегло ( $p=0.020$ ). Не намерихме значими различия в средните серумни концентрации на МСР-1 между групите разделени според наличие на чернодробна стеатоза, стадий на чернодробна фиброза, наличие на метаболитен синдром и глюкозни нарушения.

В групата на пациенти с напреднала чернодробна фиброза и чернодробна цироза (F3-F4), намерихме по-високи средни стойности на ИТМ ( $p=0.010$ ) и НОМА-IR ( $p=0.042$ ), от тези в групата на пациенти с начална или сигнификантна чернодробна фиброза (F1-F2).

Участниците с ИР квалифицирана на базата на НОМА-IR  $> 2.5$  или предиабет, ЗДТ2, показаха по-високи средни стойности на АСТ ( $p= 0.042$ ) и по-ниски стойности на тромбоцитния брой ( $p= 0.023$ ).

Не намерихме корелация на МСР-1 с показатели на чернодробно увреждане като хистологичен стадий на чернодробна фиброза, степен на некроинфламаторна активност, чернодробна стеатоза, както и с лабораторните показатели АСТ, АЛТ и неинвазивните скорове за оценка на чернодробната фиброза FIB-4 скор, APRI скор, Forns индекс. Нямаше корелация на МСР-1 с нивата на серумните липиди и с метаболитните фактори.

Анализирахме всички метаболитни фактори и липидни показатели за корелационни връзки с чернодробната фиброза, стеатоза, и помежду им. Получихме достоверни корелационни резултати за оценката на чернодробната фиброза и наличието на наднормено тегло ( $r =0.603$ ,  $p=0.004$ ), стойностите на НОМА-IR ( $r =0.576$ ,

p=0.010), серумните нива на LDL ( $r = -0.468$ ,  $p=0.033$ ) и съотношението TG/LDL ( $r = 0.517$ ,  $p=0.016$ ) [Таблица 27].

**Таблица 27. Корелации на стадия на фиброза с метаболитни и липидни показатели.**

Корелация	Наднормено тегло	HOMA-IR	LDL	TG/LDL
Стадий на чернодробна фиброза (F)	$r = 0.603$ $p = 0.004$	$r = 0.576$ $p = 0.010$	$r = -0.468$ $p = 0.033$	$r = 0.517$ $p = 0.016$

Наличието на наднормено тегло беше в корелация освен със стадия на чернодробна фиброза и със стойностите на APRI скор ( $r = 0.457$ ,  $p = 0.037$ ). Индексът на инсулинова резистентност беше в корелация също с лабораторните показатели за оценката на чернодробна фиброза – скоровете FIB-4 ( $r = 0.654$ ,  $p = 0.002$ ), APRI скор ( $r = 0.642$ ,  $p = 0.003$ ) и Forns индекс ( $r = 0.616$ ,  $p = 0.005$ ) [Таблица 28].

**Таблица 28 Корелации на HOMA-IR с неинвазивни скорове за оценка на чернодробната фиброза.**

Корелация	FIB-4 скор	APRI скор	Forns индекс
HOMA-IR	$r = 0.654$ $p = 0.002$	$r = 0.642$ $p = 0.003$	$r = 0.616$ $p = 0.005$

Достоверна корелация намерихме между ИТМ и тежеста на чернодробно увреждане представена в данните от стадия на чернодробна фиброза ( $r = 0.684$ ,  $p = 0.001$ ) и неинвазивни скорове за оценка на чернодробната фиброза – FIB-4 ( $r = 0.469$ ,  $p = 0.032$ ), APRI скор ( $r = 0.571$ ,  $p = 0.007$ ). Корелация имаше между ИТМ и стойностите на HOMA-IR ( $r = 0.802$ ,  $p < 0.001$ ) [Таблица 29].

**Таблица 29. Корелации на ИТМ с оценката на чернодробната фиброза.**

Корелация	Стадий на чернодробна фиброза (F)	FIB-4 скор	APRI скор	HOMA-IR
ИТМ	$r = 0.684$ $p = 0.001$	$r = 0.469$ $p = 0.032$	$r = 0.571$ $p = 0.007$	$r = 0.802$ $p < 0.001$

## 2. МСР-1 и серумни липиди преди и след противовирусна терапия

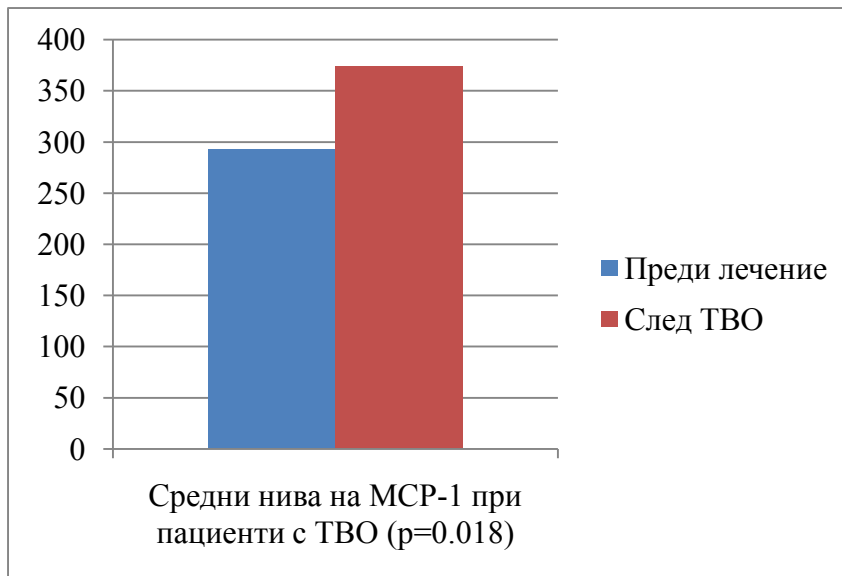
Седемнадесет пациенти проведоха стандартно противовирусно лечение. Проведохме повторни лабораторни изследвания, за да проучим връзката на МСР-1 и липидните показатели с отговора на терапията, и тяхната промяна при елиминиране на вирусната инфекция. Без оглед на вида на противовирусна терапия, траен вирусологичен отговор постигнаха 12 от лекуваните. Липса на вирусологичен отговор или релапс бяха отчетени при 5 пациенти с измерен количествено вирусен товар шест месеца след края на лечение. Участниците дадоха втора серумна проба за оценка на вирусологичния отговор и изследване на серумните нива на МСР-1, общ холестерол, HDL, LDL, VLDL, триглицериди, липопротеин (а) поне шест месеца след края на проведеното лечение. Използвани бяха методите, с които бяха изследвани изходните проби. Четири участници дадоха втора проба в рамките на 6 до 18 месеца без да е провеждано противовирусно лечение през този период.

Серумните концентрации на МСР-1 при всички измервания в проучването, с изключение на едно, бяха в порядъка на стойностите, измервани при здрави лица според по данни на производителя на използваните реактиви. Втората проба при един от постигналите ТВО пациенти беше неправилно обработена в преданалитичния етап на проучването. Стойността на МСР-1 от тази проба надвишаваше неколkokратно средната за групата и стойността от изходна проба, поради което се прие за невалидна и резултатът не беше включен в анализа на чифтни проби.

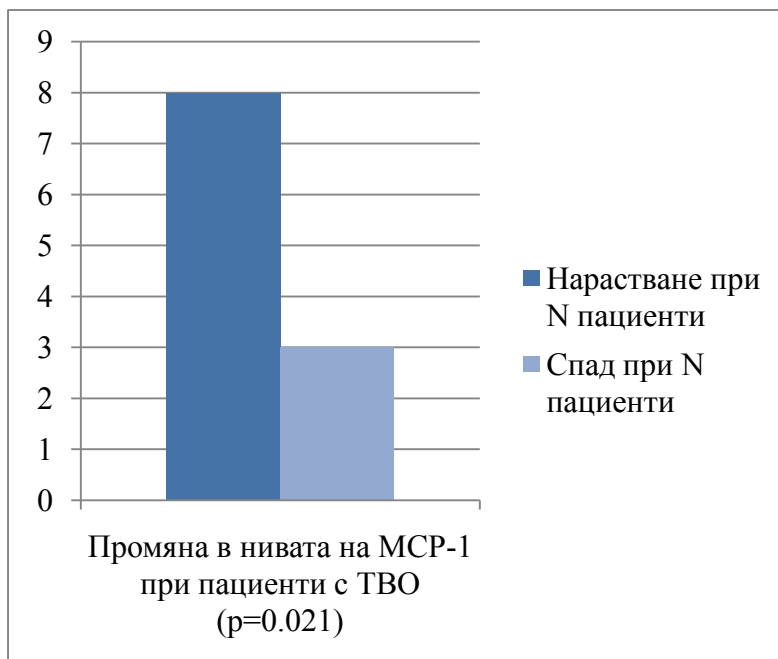
Анализирахме стойностите на МСР-1 от изходни и втори проби с методи за сравнение на средни стойности и ранг на чифтни проби. Намерихме по-високи серумни концентрации на МСР-1 във вторите проби на пациентите постигнали ТВО. Повишението отразяваше по-високи средните стойности за вторите проби ( $p=0.018$ )(Student's paired t-test) [Фигура 12].

Същевременно по-голям беше броят на пациенти (N), при които концентрацията на МСР-1 във втората проба нараства, спрямо броят на пациенти при които тя намалява или не се променя ( $p=0.021$ ) (Wilcoxon signed-rank test) [Фигура 13]. Пациентите неотговорили на противовирусно лечение и тези, проследени без лечение, нямаха значителна промяна в серумните концентрации на МСР-1 между двете проби.

**Фигура 12. Промяна в средните нива на МСР-1 преди и след терапия при пациенти постигнали ТВО.**



**Фигура 13. Брой на пациенти с нарастване или спад в нивата на МСР-1 между начало на терапията и при отчитане на ТВО.**



Анализирахме резултатите на отговорилите на противовирусна терапия участници с и без чернодробна стеатоза. Намерихме, че ръстът на МСР-1 след ТВО се запазва само в групата на пациенти със стеатоза ( $p=0.017$ ). Изходните и вторите проби не се различаваха значимо при пациентите, при които няма чернодробна стеатоза.

Проведохме анализа в групата отделно според наличието на напреднала чернодробна фиброза или чернодробна цироза (F3-F4) и според наличието на сигнификантна или по-тежка чернодробна фиброза (F2-F4). В двата случая получихме значителен ръст на концентрациите на МСР-1 в при пациентите с по-нисък стадий на фиброза – съответно при стадий на начална и сигнификантна чернодробна фиброза (F1-F2) ( $p=0.028$ ) и при начална чернодробна фиброза (F1) ( $p=0.025$ ). Достоверността на резултатите се изгуби за групата, в която попадат случаите на напреднала чернодробна фиброза и чернодробна цироза (F3-F4) и в двата анализа. Средните стойности на серумните липиди не отбелязаха статистически значима динамика при анализ между изходната и втората проба, независимо от отговора на противовирусна терапия.

## VII. ОБСЪЖДАНЕ

При част от болните с ХХС чернодробното заболяване е с бързопрогресиращ ход на развитие – може да доведе до чернодробна цироза и ХЦК за по-малко от 20 години. При други болестта прогресира бавно и не довежда до тежко чернодробно заболяване в продължение на десетилетия. Хода и прогресията на чернодробното заболяването се определят от фактори на вируса и фактори на гостоприемника, между които протичат разнопосочни имунни и метаболитни взаимодействия [86].

Серумни липидни нарушения се срещат при хронични чернодробни заболявания с различна етиология, поради централната роля на черния дроб в образуването и обмяната на липопротеините. Дислипидемия с хиперлипидемия по-често се среща при пациентите с ХХС със стеатоза (високи триглицериди или нисък HDL) и при НАСБ (висок общ холестерол, висок LDL, високи триглицериди или нисък HDL), отколкото при ХХС без стеатоза и при здрави лица. Сред пациентите НАСБ най-честа е хиперхолестеролемията, следвана от хипертриглицеридемия, висок LDL и нисък HDL. При ХХС със стеатоза ниският HDL е най-честото отклонение. Средните серумни нива на LDL се измерват най-ниски при ХХС без стеатоза в сравнение с ХХС със стеатоза, НАСБ и здрави лица [155]. Въпреки различията в дислипидемията при ХХС генотип 1 и НАСБ, ИР е общ фактор, който се свързва с прогресия на чернодробното увреждане и повишен кардиометаболитен риск при двете заболявания [5, 80, 81, 82, 83].

В настоящите проучвания не поставихме строги изключващи критерии по отношение на заболявания участващи в спектъра на извънчернодробни прояви на ХХС. В проучване на серумните липидни нива за различна характеристика и стадий на фиброза при ХХС бяха включени пациенти с ЗДТ2, наднормено тегло и затлъстяване, метаболитен синдром. Поради относително високия брой на пациенти с чернодробна цироза в групата ни (35%), в тази група попаднаха и повече случаи на ЗДТ2. Налице е съвкупност от метаболитни фактори при част от нашите пациенти с ХХС и приехме, че е отразена в резултатите. Метаболитните фактори съпътстваха особено често резултатите за напреднало чернодробно увреждане, макар че участието им в него не може да бъде изчислено.

При ХХС генотип 3 метаболитните фактори (триглицериди, ИТМ, пикочна киселина) корелираха помежду си, без силна връзка с показателите на чернодробното увреждане. Независимо от наличието на чернодробна стеатоза, при ХХС генотип 1 стойностите на глюкозата корелираха с оценката на чернодробната фиброза и и

компоненти на метаболитния синдром. ИТМ, глюкозата и метаболитния синдром корелираха с показателите на чернодробно увреждане (стадий на фиброза и неинвазивни скорове за фиброза) най-значимо при ХХС генотип 1 със стеатоза. Метаболитния синдром се свързваше с по-висок АЛТ, а хиперинсулинемията с по-високи нива на триглицериди. Понижените стойности на HDL при пациенти със и без стеатоза, със и без чернодробна цироза се проявиха като обратна корелация в резултатите, както за метаболитни фактори (ИТМ, коремна обиколка, метаболитен синдром, глюкоза, пикочна киселина) така и за показатели на чернодробното увреждане при ХХС (АЛТ, чернодробна цироза). HDL при ХХС се влияе едновременно от хипохолестеролемията свързана с напредналата чернодробна фиброза и от наличието на метаболитно увреждане [Таблица 17 и 18].

Докладвани са ниски нива на общ холестерол и LDL, или на HDL и триглицериди при пациенти с ХХС с напреднала чернодробна фиброза. Известни са и наблюдения, че промени в липидните показатели настъпват още във острата фаза на HCV инфекцията, която не се характеризира с чернодробна фиброза. Резултатите от нашите проучвания говорят също за поддържане на ниски серумни холестеролови нива (общ холестерол и LDL) при пациенти с ХХС. Ниските холестеролови нива корелираха с високите стадии на чернодробна фиброза в нашата група – напреднала септална фиброза и чернодробна цироза ( $F \geq 3$ ). Серумните триглицеридни нива същевременно бяха свързани с по-високи стойности на неинвазивните скорове за оценка на чернодробната фиброза, без да имат връзка с директната оценка на стадия на фиброза или чернодробната стеатоза [35, 109, 119].

Проучихме Lp (a), познат като независим генетично обусловен рисков фактор за сърдечно-съдова заболяемост. Макар да има в състава си Апо-В, пренася холестерол и оксидирани фосфолипиди, натрупаните до момента литературни данни посочват, че серумните му нива не се регулират от LDLR [21, 111, 112]. Корелацията на повишените серумни концентрации на този липопротеин с изява на атеросклерозата като коронарна, мозъчно-съдова и периферна съдова болест е известна от многобройни проучвания. Малка част от нивото на Lp (a) в кръвотока се влияе от начина на хранене, възрастта, хормоналния статус. Данните за този показател при чернодробни заболявания и ХХС са ограничени [25, 65, 85, 168]. В част от представените в проучванията данни се съобщават повишени нива на Lp (a) при участници с метаболитен синдром, затлъстяване или ЗДТ2 [25]. Ниски серумни нива на Lp (a) се съобщават за групи пациенти с различни вирусни чернодробни заболявания в сравнение със здрави

индивиди [85]. Отбелязва се покачване на серумните нива на Lp (a) след лечение с интерферон алфа при пациенти с ХХС, което е интерпретирано като отражение на подобрена чернодробна функция [65]. Честотата на Lp (a) дислипидемията беше подобна при ХХС и НАСБ в нашия анализ. Средните нива при НАСБ обаче надвишаваха тези при ХХС, независимо от наличието на стеатоза. При ХХС стеатозата не беше определяща за средните му нива. Тази зависимост показва, че показателят се влияе от стеатозата, когато тя е се дължи изцяло на метаболитни фактори. В корелационния анализ, Lp (a) показва връзки с други показатели аналогични с тези на non-HDL и LDL при пациенти с ХХС генотип 1 със стеатоза. Lp (a) се измерва в състава на тези липопротеини, което обяснява сходството на корелационните резултати. При ХХС генотип 1 със стеатоза нивата на Lp (a) бяха свързани обратнопропорционално с някои показатели на напреднало чернодробно заболяване. Слабата корелация обаче не предполагаше този показател да се проучва като параметър за оценката на чернодробното увреждане. Не намерихме връзка на серумните нива на Lp (a) с възрастта, пола и метаболитните параметри при нашите пациенти с ХХС.

При ХХС генотип 3 се съобщават по-ниски серумни нива на общ холестерол, HDL и LDL от същите показатели при здрави лица, както и корелация между вирусния товар и характерната за инфекцията с този генотип чернодробна стеатоза [138]. Резултатите от нашето проучване при 14 пациенти подкрепят разбирането, че вирусът от този генотип взаимодейства в по-голяма степен с вътреклетъчните липиди. Това се обяснява с малка разлика в структурата на HCV Ag между генотип 1 и 3 на вируса, които определят по-силната му връзка с липидните капчици в хепатоцита [67]. Така индуцираната стеатоза е в корелация с вирусния товар. Повечето корелационни резултати и сравненията в групите не достигнаха достоверността, която имаха в общата с преобладаващ ХХС генотип 1 група. По-тежката стеатоза и малкият брой на групата могат да обяснят непостоянството на тези резултати и не дават достатъчно основание за заключения.

В няколко съобщения се посочва директна асоциация на вирусния товар със серумни липидни. Корелационния или регресионния анализ при тях е проведен при данни с нормално разпределение, постигнато с логаримично преобразуване на показателите [123, 128, 157]. За разлика от предходните проучвания използвахме абсолютните стойности на серумните липиди в корелационния анализ, а вирусния товар анализирахме като абсолютна (IU/ml) и логаритмична стойност. Корелацията, която намерихме между триглицериди и богатите на триглицериди VLDL, и вирусния

товар, беше еднакво достоверна за абсолютната и логаритмичната стойност на показателя при непараметричния корелационен метод.

Наблюдавахме някои клинични разлики между пациентите свързани с двата генотипа на инфекцията. При ХХС генотип 1 пациентите бяха в по-голям възрастов диапазон, по-равномерно разпределени по отношение на стадий на наличието на стеатоза и фиброза, и с по-голямо относително значение на метаболитните фактори. При ХХС генотип 3 чернодробното увреждане се водеше от чернодробната стеатоза, без отчетливо влияние на метаболитните фактори и количествено свързана с вирусния товар.

Вирусният жизнен цикъл се благоприятства от повишен внос на холестерол пренасящи частици и повишен износ от хепатоцитите на богати на триглицериди ЛВЧ. В резултат серумните нива на холестерол се поддържат ниски, за сметка на относително повишено ниво на триглицериди и VLDL в липопротеините, и в кръвотока като цяло. Ефектът върху понижения общ холестерол при наличие на чернодробна цироза се подсилва от намалената хепатоцелуларна маса.

Имунните и метаболитните механизми на ХХС действат от самото начало на инфекцията предимно върху хепатоцитите в перипорталната зона на чернодробния ацинус – тези, които синтезират по-голямата част от ендогенния холестерол. Нарушеното функционално зонироване на хепатоцелуларната маса при ХХС е още един фактор, който би могъл да допринася едновременно за по-ниските нива на холестерол и за метаболитно увреждане на хепатоцитите, не всички от които са инфектирани с HCV. Нарушеното функционално зонироване би могло да обясни тежестта и по-бързата прогресия на чернодробното увреждане при пациентите с ХХС със затлъстяване, ИР и метаболитен синдром предразположени и към НАСБ. [81, 101, 133].

\* \* \* \* \*

Съотношението TG/LDL математически разкрива диспропорцията между двата показателя и разнопосочните ефекти на напредналата чернодробна фиброза и цироза върху серумните нива на холестерол, и триглицериди. Съчетанието на ниски общ холестерол и LDL при нормални или относително повишени триглицеридни нива съпътстваше наличието на напреднала фиброза и чернодробна цироза при ХХС. Наличието на глюкозни нарушения не беше съпътствано от комбинирана хиперлипидемия както при НАСБ. ЗДГ2 в групата беше свързан с нисък общ

холестерол, нисък HDL и без изразена хипертриглицеридемия, вместо характерната за метаболитния синдром смесена хиперлипидемия. Глюкозните нарушения допринесоха за по-високи серумни нива на триглицериди и по-високи стойности на скорвата оценката на чернодробната фиброза, но не и на чернодробната стеатоза.

Наличието на стеатоза при ХХС генотип 1 се характеризираше с по-висок тромбоцитен брой и общ холестерол. Тези два показателя отличаваха състоянието, но диагностичните им възможности бяха като цяло ниски, на базата на малката площ под ROC кривата. Стеатозата оказва влияние върху серумните липидни нива и оценката на чернодробната фиброза с TG/LDL, затова беше необходимо да се отчита при измерванията и анализът им. Наличието на чернодробно увреждане по типа на стеатофиброза или стеатоцироза се отразяваше негативно на чувствителността и специфичността на TG/LDL. Отдаваме го на самостоятелния ефект на стеатозата върху нивата на серумните липиди и корелацията ѝ с нивата на общ холестерол и LDL.

В групата от пациенти, при които проучихме нивата на серумни липиди и TG/LDL, в стадий на чернодробна цироза бяха 35% от участниците. За оптимално съчетание от чувствителност и специфичност приехме нивата на TG/LDL, при които сборът от чувствителността и специфичността беше максимален. TG/LDL притежаваше значителна чувствителност при стойности над 0.32 и специфичност при стойности над 0.52 за предсказване на напреднала чернодробна фиброза и цироза, особено при пациентите без стеатоза. Резултатите за TG/LDL позволяват съотношението да се разглеждат като потенциален маркер за чернодробно увреждане. Подобен анализ е необходимо да се проведе в по-голяма група от хистологично оценени пациенти с ХХС генотип 1, за да се провери потенциалната му диагностична стойност.

APRI и FIB-4 скоровете се представиха добре в нашата група от пациенти, според площта под ROC кривата за основен измерител на диагностичната стойност на тестовете, независимо от наличието на чернодробна стеатоза. Когато комбинирахме TG/LDL с APRI скор, идентифицирахме по-голям брой случаи с чернодробна цироза, отколкото при всяка една от другите комбинации от скорове. Ефектът от комбинацията им е адитивен, тъй като TG/LDL идентифицира част от случаите на чернодробна цироза, в които стойностите на АСТ и тромбоцитния брой са близки до нормалните. Същевременно APRI скорът долови случаи на чернодробна цироза, в които серумните нива на общ холестерол и LDL са под влиянието на чернодробната стеатоза (стеатоцироза).

В оценката на чернодробната фиброза се използват първо и предимно неинвазивни методи, маркери и скорове – еластография, директни и индиректни неинвазивни маркери за чернодробна фиброза, скорове съставени от тях, и комбинирането им в алгоритми. Маркерите отразяват в различна степен неспецифични механизми на прогресията на чернодробното увреждане и се влияят от спецификата на етиологични фактори. При транзиторната еластография също се измерват по-високи стойности на LS при ХХС сравнено с ХХВ за хистологично еднакъв стадий на фиброза. При ХХС стойността на LS корелира с по-висока достоверност със стадия на фиброза по METAVIR, в сравнение с LS при ХХВ. Неинвазивните методи за оценка на чернодробната фиброза се развиват бързо и придобиват по-широка употреба с в стремежа да се замести чернодробната биопсия [1, 43, 135].

Съпоставихме оценката на чернодробната фиброза хистологично и неинвазивно с транзиторна еластография с корелационен анализ и анализ на ROC крива. Изведените от нас стойности на LS съответстват на оптималното сечение между чувствителност и специфичност, постигнато за съответния стадий на фиброза в нашите пациенти. Нямаше значима разлика между праговете нива за LS за ХХС изведени от предходни проучвания [30, 172] и стойностите получени от нас, но при вариращи нива на чувствителност и специфичност. За всяко ниво на LS отговаря ниво на чувствителност и специфичност, с които се предсказва даден стадий на фиброза. Разделянето на групата на напреднала (F3-F4) и ненапреднала (F1-F2) фиброза демонстрира значително по-високата стойност на метода за по-високите стадии на фиброза при ХХС. Правилната интерпретация на нивата на LS е като обхват, в който попада с най-голяма вероятност съответния стадий на фиброза.

При използване на метода следва да се имат предвид фактори, които могат да затруднят измерването или да доведат до високи стойности на LS, без да се дължат на напреднала чернодробна фиброза: затлъстяване, остро чернодробно увреждане (десетократно и повече завишени трансаминази) при вирусен хепатит, декомпенсирана хронична застойна сърдечна недостатъчност с чернодробен венозен застой, екстрахепатална холестаза [13, 31, 95, 105]. Разликата в биохимичната активност при пациентите – от нормална до умерено повишена аминотрансферазна активност, би могла да бъде източник на дискордантност между измереният LS и хистологичния стадий в нашите резултати [84, 103, 104]

Обща черта на неинвазивните методи за оценка на чернодробната фиброза е липсата на точност при разграничаване на последователни по тежест стадии на фиброза

съответстващи на оценката по METAVIR. Това води до широка „сива зона” на методите. Наблюдавахме го при транзиторната еластография и го проучихме при съотношението TG/LDL. С напредване на фиброзата нарастват чувствителността и специфичността, с които тя може да бъде оценена еластографски и като цяло неинвазивно. Разделянето на групата на напреднала (F3-F4) и ненапреднала (F1-F2) чернодробна фиброза демонстрира по-успешно различаването на ниските от високите стадии на чернодробна фиброза. При използване на TG/LDL имахме значими резултати единствено за стадията на напреднала фиброза и чернодробна цироза. Стойността на маркера се загуби за стадия на напреднала чернодробна фиброза при отчитане на влиянието на чернодробната стеатоза. Предвид това TG/LDL може да бъде обсъждан като потенциален маркер за чернодробна цироза, а не като такъв за разграничаване на всички стадии на чернодробна фиброза. При стойности на TG/LDL над 0.52 броят на случаи с чернодробна цироза значително надвишаваше броя на случаите с по-нисък стадий на чернодробна фиброза. Със стойности на TG/LDL до 0.32 бяха 10% от всички случаи на чернодробна цироза в групата, а останалите 90 % съответно над 0.32. За всяка стойност от ROC кривата на TG/LDL, както и на LS, отговаряше ниво на чувствителност и специфичност, с които се предсказва даденото състояние. Приехме, че по-ниската стойност на TG/LDL от 0.32 има добра чувствителност за разграничаването на случаите с чернодробна цироза от тези в по-нисък стадий на фиброза. Специфичността обаче в тази ситуация беше ниска. При стойности под 0.32 TG/LDL е потенциален маркер за изключване на чернодробна цироза при ХХС генотип 1. При по-високата стойност 0.52 специфичността за разграничаване на случаите с чернодробна цироза се повиши. В този случай обаче чувствителността беше по-ниска поради случаите с чернодробна стеатоза, при които не беше възможно да се определи отделния принос на чернодробната фиброза и стеатоза върху стойностите на серумните триглицериди, LDL и съотношението им. Изведените от нас стойности на TG/LDL отразяват оптималното сечение между чувствителност и специфичност, за стадия на чернодробна цироза при нашите пациенти. Правилната им интерпретация е като обхват, в който попадат с по-голяма вероятност случаите на чернодробна цироза при ХХС генотип 1.

\* \* \* \* \*

Връзката на серумните концентрации на MCP-1 с ИТМ, наднормено тегло и затлъстяване е известна от литературните данни, но не е изследвана при HCV инфектирани лица със наднормено тегло. При нашите пациенти с ХХС оценката на чернодробната фиброза – хистологична и лабораторна, беше свързана с показатели на инсулиновата резистентност и наднормено тегло. Механизмите, по които мастната тъкан и системната възпалителна активност подхранват възпалението и фиброгенезата в черния дроб са обект на проучвания в областта на НАСБ и ХХС. Литературните данни подкрепят участието на MCP-1 като една от многото сигнални молекули в тези проинфламаторни и профибротични пътища. Получените в нашето проучване резултати не подкрепят директно участие на серумния MCP-1 в този процес. В най-голяма степен резултатите могат да бъдат обяснени от действието на дисфункционалната мастна тъкан и ИР, които едновременно създават профибротична среда в условията на хронична чернодробна болест, и нискостепенна системна възпалителна активност.

Възпалителния процес с участието на MCP-1 и CCR2 се поддържа автокринно. Потвърдено е значението на локалните концентрации на хемокина за миграцията на притежаващите рецептора клетъчни елементи. Може да се предположи, че промяната в локалното или системно възпаление е свързана и с промяна в концентрациите на хемокина, оттам и в градиент-зависимия хемотаксис на клетките. Измерихме повишение спрямо изходните стойности при пациентите, при които противовирусната терапия доведе до ТВО. Такава промяна нямаше при пациентите, при които се запази статуса на хронична HCV инфекция. При анализа в подгрупите това повишение произхождаше от пациентите със стадий на чернодробна фиброза F1-F2 и с чернодробна стеатоза.

MCP-1 не показва пряка връзка с оценката на чернодробната стеатоза и фиброза в групата. Възможно е серумните концентрации на хемокина да не са определящи за ролята му в чернодробното увреждане, предвид на това, че измерените стойности в групата не се различаваха от измерваните при здрави индивиди. При пациентите с ненапреднало чернодробно увреждане е съхранен и по-голям регенераторен потенциал. След стихване на възпалителната активност и възстановяването на нормалните имунни и метаболитни отношения в черния дроб, фибролизата взема превес над фиброгенезата. Клетъчните елементи, които регулират процеса на трансдиференциация и

миофибробластна активация, имат участие и в оздравителна по отношение на чернодробния паренхим активация. Клетките от ММФС имат водеща роля в дезактивирането на трансформираните миофибробласти [16]. Хемотаксисът воден от MCP-1 е зависим от концентрационния градиент на хемокина. Флукуацията в серумната концентрация на MCP-1 след ТВО можем да свържем с процес на динамична подмяна на проинфламаторни и профибротични клетъчни субпопулации с ресторативно активирани такива.

Клетките на ММФС проявяват функции свързани с метаболизма и трансфера на Апо-В съдържащи липопротеини в кръвотока и върху ендотелната стена. Така те свързват имунни и метаболитни патогенетични пътища в условията на хронична HCV инфекция [22,60, 74, 159, 162]. Нарастване на нивата на серумните липиди, които имат свойството да свързват хемокина [оксидирани LDL и Lp (a)], също би могло да обясни нарастването на серумния MCP-1 след ТВО [166]. Елиминирането на вирусната инфекция води до нарастване на общия холестерол и богатите на холестерол липопротеини [36, 123, 128, 169]. Вероятно поради малкия брой анализирани случай и малката абсолютна стойност в промените на липидните нива, нашите резултати не достигнаха ниво на достоверност за тази хипотеза. Средните нива на серумни липиди не се различаваха между изходната и втората проба. Наблюдаваха се малки вариации в посока на нарастване в серумните нива на общ холестерол, non-HDL, LDL при 8 от 12 пациенти постигнаха ТВО. При 9 от тях незначително спадна стойността на съотношението HDL/non-HDL. Серумните нивата на HDL, Lp(a), триглицериди и VLDL имаха спад или нарастване при еднакъв брой пациенти (6 от 12) отново без значими разлики в средните стойности. В 8 от 11 случая, колебанията в серумните нива на общ холестерол и LDL бяха еднопосочни с нарастването или спада в серумната концентрация на MCP-1 между първа и втора проба.

Групата за проучване на MCP-1 беше от 21, предимно хистологично верифицирани пациенти с ХХС генотип 1 и 3. При пациентите с напреднала чернодробна фиброза и цироза (F3-F4) намерихме по-високи средни стойности на ИТМ и НОМА-IR от тези с начална или сигнификантна чернодробна фиброза (F1-F2). Потвърди се и силната корелация на TG/LDL със стадия на чернодробна фиброза и отрицателната такава с нивата на LDL. По-високите средни стойности на АСТ, скоровете FIB-4, APRI, Forns индекс и по-ниските стойности на тромбоцитния брой при участниците с данни за ИР (на базата на НОМА-IR, предиабет, ЗДТ2) очертаха известната от предходни проучвания асоциация на напредналото чернодробно

заболяване при ХХС с метаболитните фактори, в това число с наличието на наднормено тегло, НОМА-IR. [4, 12, 15, 80, 81, 91, 116, 143]. Съществуват общи механизми обединяващи метаболитните фактори, възпалението, ендотелната дисфункция и чернодробното увреждане при ХХС. Проучването на серумния МСР-1 в този формат не разкрива сложността на тези многопосочни взаимодействия, но разкрива различна реакция на клетъчния имунитет след ТВО при ХХС пациенти с и без стеатоза, с и без сигнификантна фиброза.

Съчетанието метаболитни (липидни и глюкозни) нарушения, чернодробно увреждане, персистираща имунна активация, създава уникален имуно-метаболитен профил на хроничната HCV инфекция. ХХС е свързан с кардиометаболитен риск, дължащ се на цялостния метаболитен профил на хроничната инфекция, при променени параметри на липидната обмяна. Преплитането на метаболитни фактори, фактори на вируса, генетични фактори, различно по тежест и характеристика чернодробно увреждане, надграждането от традиционни рискови фактори, правят оценката на кардиометаболитния риск при пациенти с ХХС сложна интердисциплинарна задача, независимо от постигането на ТВО. Не е надеждно стратифицирането му според нивата на липидните показатели поради променените съотношения в липидния профил свързани с инфекцията, стадия и характеристиката на чернодробното увреждане. Прогресията на чернодробната стеатоза и фиброза, рефлектира в нарастване на сърдечносъдовия риск. Възможно е промените в липидните нива след ТВО да са израз на възстановителен процес, в който се „освобождава” холестероловия синтез и метаболизъм от влиянието на вирусните протеини и претърпява обратно развитие вирус-индуцираната чернодробна стеатоза. Метаболитните фактори са решаващи за чернодробното увреждане и кардиометаболитния риск след елиминиране на вирусната инфекция с противовирусни средства.

## VIII. ИЗВОДИ

1. При ХХС настъпват промени в липидната обмяна, които имат значение за поддържането на хроничната инфекция, формирането на чернодробна стеатоза и прогресия на чернодробното заболяване.
2. Навлизането в хепатоцитите на богати на холестерол частици и изнасянето в кръвотока на богати на триглицериди VLDL-подобни ЛВЧ по пътя на VLDL благоприятства вирусния жизнен цикъл.
3. Чернодробната стеатоза и ЛВЧ в кръвотока свързват генетичните, имунните и метаболитните механизми, с които се осъществява персистенцията на HCV и хроничното чернодробно увреждане. Чернодробната стеатоза, индуцирана от вирусни, метаболитни или съчетание от фактори, благоприятства вирусния жизнен цикъл и прогресията на чернодробното увреждане при ХХС.
4. Нивата на Lp (a) при пациенти с ХХС са по-ниски от тези при НАСБ. При ХХС със стеатоза нивата на Lp (a) са в обратна зависимост със стадия на чернодробна фиброза оценена с лабораторни скорове.
5. Нивата на общ холестерол, LDL, триглицериди и съотношението TG/LDL при ХХС зависят от наличието на чернодробна стеатоза, стадия на чернодробна фиброза и генотипа на HCV инфекцията. Съществуват различия между генотип 1 и 3 на вируса по отношение на степента им на асоциация с интрацелуларните липидни капчици и серумните липиди.
6. Липидните показатели намират приложение в оценката на чернодробното увреждане и в прогнозата на чернодробната болест. Разнопосочният ефект на чернодробната фиброза и цироза върху серумните нива на триглицеридите, и LDL превръщат съотношението TG/LDL в потенциален маркер за чернодробна цироза при хронична инфекция с HCV генотип 1. Стойности на съотношението над 0.52 насочват с висока специфичност към чернодробна цироза, а стойности до 0.32 могат да допринесат за изключването на такава.
7. Чернодробната стеатоза влияе на стойностите на липидните измервания различно от чернодробната фиброза и цироза. Предсказващата стойност на съотношението TG/LDL за чернодробна фиброза и цироза намалява при наличието на чернодробна стеатоза.

8. TG/LDL съчетан с индиректни неинвазивни скорове за оценка на фиброзата като APRI скор и FIB-4 скор, подобрява разкриването на случаи с чернодробна цироза.
9. Широко достъпните неинвазивни индиректни скорове за чернодробна фиброза и транзиторната еластография имат добра предиктивна стойност в разграничаването на начална от напреднала чернодробната фиброза при ХХС. Те не са достатъчни да заменят референтния стандарт на хистологичното изследване за пълния спектър на чернодробното увреждане. Комбинирането на разнотипни неинвазивни методи позволява откриването на повече случаи на чернодробна цироза.
10. Серумните концентрации на МСР-1 при ХХС зависят от наличието на наднормено тегло и затлъстяване. Наднорменото тегло, затлъстяването и ИР са свързани с прогресията на чернодробната фиброза при ХХС.
11. След лечение и ТВО се наблюдава нарастване на МСР-1. При пациентите с чернодробна стеатоза и тези без напреднала фиброза, ръстът в нивата МСР-1 е значим. Чернодробната стеатоза има значение за имунния отговор след ТВО при ХХС.
12. Самостоятелното значение на чернодробната стеатоза при ХХС има основание да бъде проучено като фактор за прогресия или липса на адекватна регресия на чернодробното заболяване след ТВО.
13. Кардиометаболитния риск при пациентите с ХХС не се определя от серумните холестеролови нива, базира се на традиционните рискови фактори и системна възпалителна активност, която произхожда от персистираща активация на клетъчния имунитет.
14. Метаболитните фактори, които допринасят за прогресията на чернодробната стеатоза и фиброза, допринасят същевременно за кардиометаболитния риск при пациентите с ХХС.

## **IX. НАУЧНИ ПРИНОСИ**

### **Оригинални научно-теоритични приноси:**

1. Обяснени са двупосочните зависимости между характеристиката и тежестта на чернодробното заболяване при ХХС и промените в серумните липидни показатели: по-високи стойности на общия холестерол и LDL при чернодробна стеатоза; редукция на стойностите на общия холестерол и LDL с напредване на чернодробната фиброза към цироза.
2. Анализирани са механизмите на ИР, чернодробна стеатоза, нискостепенна системна възпалителна активност и ендотелна дисфункция паралелно за НАСБ и ХХС.
3. Предложено е морфологично обяснение на взаимодействията между вирусните и метаболитните фактори в чернодробния паренхим, като се позовава на данните за нарушено функционално зонирание на метаболитните процеси и последващо метаболитно увреждане на хепатоцитите при хроничната HCV инфекция.

### **Потвърдителни научно-теоритични приноси**

4. Обяснени са механизмите на взаимодействие на HCV с основните липиди и транспортни липопротеини в човешкия организъм.
5. Обяснено е значението на липидните частици за вирусния жизнен цикъл и поддържането на хроничната инфекция.
6. Разграничено е значението на отделните фактори определящи тези взаимодействия – генотип на вируса, клиничен ход на HCV инфекцията, терапевтичен отговор, генетични предпоставки при човека.
7. Обяснени са предпоставките за формирането на чернодробната стеатоза и значението ѝ за ХХС.
8. Обяснени са механизмите, с които клетките на ММФС участват в промотиране на възпалението, фиброгенезата и в обратното развитие на чернодробното увреждане.

9. Потвърди се корелацията между количествените измервания на вирусния товар и серумните триглицериди при инфектираните с HCV генотип 1, и съответно процент на хепатоцити засегнати от липидни отлагания при генотип 3.
10. Потвърди се асоциацията между показателите на ИР, ИТМ - наднормено тегло и затлъстяване, и наличието на напреднала чернодробна фиброза и цироза при ХХС.
11. Потвърди се корелацията на MCP-1 с ИТМ и наличието на наднормено телесно тегло при ХХС.
12. Потвърди се корелацията на показателя LS със стадия на чернодробна фиброза и възпроизводимостта на транзиторната еластография.

### **Оригинални научно-приложни приноси**

1. Проучени са серумните общ холестерол, LDL, HDL, VLDL, триглицериди, Lp(a) и съотношения между тях за предиктивната им стойност в оценката на чернодробната стеатоза, фиброза и цироза;
2. Сравнени са серумните общ холестерол, LDL, HDL, триглицериди и Lp(a) при пациенти с НАСБ, ХХС с и без чернодробна стеатоза.
3. Намерена е корелация на триглицеридните нива с по-високи стойности на неинвазивните скорове за оценка на чернодробната фиброза; по-високи стойности на TG/LDL при напреднала чернодробна фиброза и цироза. Изведено и проучено е приложението на съотношението TG/LDL за неинвазивна оценка на стадия на чернодробна фиброза и диагнозата на чернодробната цироза.
4. Изведена е чернодробната стеатоза като фактор, свързан с по-високи стойности на LDL и общ холестерол, оказващ негативен ефект върху специфичността и чувствителността на TG/LDL за разграничаването на напреднала чернодробна фиброза и цироза.
5. Предложен е подход на съчетаване на TG/LDL с APRI скор и FIB-4 скор при наличието на чернодробна стеатоза при ХХС, като така диагностичните им възможности се допълват.

## **Потвърдителни научно-приложни приноси**

6. Проучена е транзиторната еластография и съпоставени резултатите със стадия на фиброза или чернодробна цироза, за първи път в група български пациенти с ХХС. Изведени са близки до посочените в литературните данни прагови стойности на показателя за стадията на сигнификантна, напреднала септална фиброза и чернодробна цироза при български пациенти с ХХС.

## Х. ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов, К., Вълков, И., Попов, Д., Алексиев, А. FibroScan за оценка на чернодробната фиброза при пациенти с хронични HBV и HCV инфекции. Българска Хепатогастроентерология, Бр.2, 2014г, 28-32.
2. Мечков, Григор. Фиброза. В Болести на храносмилателната система. Хепатология. (Под ред. Проф. З. Кръстев, проф. К. Чернев), Тилия, София, 1998, 56-65.
3. Работна група към Българския институт “Метаболитен синдром” (БИМС), Национален консенсус за поведение при метаболитен синдром, 2010 г.
4. Adinolfi, LE., Rinaldi, L., Guerrera, B. et al. NAFLD and NASH in HCV infection: prevalence and significance in hepatic and extrahepatic manifestations. - Int J Mol Sci., 2016, 17(6).
5. Adinolfi, LE., Restivo, L., Zampino, R. et al. Chronic HCV infection is a risk of atherosclerosis. Role of HCV and HCV-related steatosis. Atherosclerosis. 2012 Apr; 221(2):496-502.
6. Adler, M., Gulbis, B., Moreno, C. et al. The predictive value of FIB-4 versus FibroTest, APRI, FibroIndex and Forns index to noninvasively estimate fibrosis in hepatitis C and nonhepatitis C liver diseases. Hepatology. 2008 Feb; 47(2):762-3.
7. Alberti, KG., Zimmet, P., Shaw, J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. Diabet Med. 23, 2006, 5, 469-80.
8. Amako, Y., Munakata, T., Kohara, M. et al. Hepatitis C virus attenuates mitochondrial lipid  $\beta$ -oxidation by downregulating mitochondrial trifunctional-protein expression. J Virol. 2015 Apr; 89(8): 4092–4101.
9. Andersen, ES., Ruhwald, M., Moessner, B. et al. Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011, 30:761–766.
10. André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S. et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. J Virol. 2002 Jul; 76(14):6919-28.
11. Antonov, K., Jeleв, D., Ivanova, A., et al. The impact of liver steatosis on the efficiency of treatment with peginterferon alfa-2a and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C infection. Journal of Clinical Medicine 2009 Jan; 21-25.

12. Antonov, K., Jeleu, D., Ivanova, R. et al. Metabolic face of chronic hepatitis B and C in Bulgaria, *Journal of IMAB : Annual Proceeding (Scientific Papers)* 2011, Vol. 17, No. 1, pp. 193-196(4).
13. Arena, U., Vizzutti, F., Corti, G. et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008 Feb, 47(2):380-4.
14. Arzumanyan, A., Reis, H., Feitelson, M. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Cancer*, 2013. 13, 123–135
15. Asselah, T., Rubbia-Brandt, L., Marcellin, P. et al. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? - *Gut*. 2006; 55(1):123-30.
16. Baeck, C., Wei, X., Bartneck, M., et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C<sup>+</sup>macrophage infiltration in mice. *Hepatology* 2014 Mar; 59(3):1060-72.
17. Barakat, A., Nasr, F., Metwaly, A. et al. Atherosclerosis in chronic hepatitis C virus patients with and without liver cirrhosis. *The Egyptian Heart Journal* 2017 Jun, Vol. 69, ( 2), pp. 139-147.
18. Barnaba, Vincenzo. Hepatitis C virus infection: A “liaison a trois” amongst the virus, the host, and chronic low-level inflammation for human survival. *Journal of Hepatology* 2010 Oct, Vol. 53, (4), pp. 752-761
19. Bassani, L., Fernandes, SA., Raimundo, FV. et al. Lipid profile of cirrhotic patients and its association with prognostic scores: a cross-sectional study. *Arq Gastroenterol*. 2015 Jul-Sep; 52(3):210-5.
20. Bedossa, P., Moucari, R., Chelbi, E. et al. Evidence for a role of nonalcoholic steatohepatitis in hepatitis C: a prospective study. *Hepatology* 2007, 46, 2, 380-7.
21. Berglund, L., Ramakrishnan, R. Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Dec; 24(12): 2219–2226.
22. Bermudez, B., Lopez, S., Varela, LM. et al. Triglyceride-rich lipoprotein regulates APOB48 receptor gene expression in human THP-1 monocytes and macrophages. *J. Nutr*. 2012 Feb, Vol.142, No. 2, 227-232.
23. Bhatia, LS., Curzen, NP., Calder, PC. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? - *Eur Heart J*. 2012 May; 33(10): 1190-200.
24. Boyer, A., Dumans, A., Beaumont, E. et al. The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *J Biol Chem*. 2014 Jul ;289(27):18904-13.

25. Bozbaş, H., Yildirim, A., Pirat, B. et al. Increased lipoprotein(a) in metabolic syndrome: is it a contributing factor to premature atherosclerosis? *Anadolu Kardiyol Derg.* 2008 Apr;8(2):111-5.
26. Brenndörfer, D., Brass, A., Söderholm, J. et al. Hepatitis C virus non-structural 3/4A protein interferes with intrahepatic interferon-g production *Gut* 2012; 61:589e596.
27. Bruno, S., Zuin, M., Crosignani, A. et al. Predicting mortality risk in patients with compensated HCV-induced cirrhosis: a long-term prospective study. *Am J Gastroenterol.* 2009 May;104(5):1147-58.
28. Brunt, E., Janney, C., Di Bisceglie, A. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999 Sep; 94 (9): 2467–2474.
29. Carlin, A., Aristizabal, P., Song, Q. et al. Temporal dynamics of inflammatory cytokines/chemokines during sofosbuvir and ribavirin therapy for genotype 2 and 3 hepatitis C infection. *Hepatology.* 2015 Oct; 62(4): 1047–1058.
30. Castéra, L., Forns, X., Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008 May;48(5):835-47.
31. Castéra, L., Foucher, J., Bernard, PH. et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology* 2010 Mar; 51(3): 828-35.
32. Charlton-Menys, V., Durrington, PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol.* 2008 Jan; 93(1):27-42.
33. Chou, R., Wasson, N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2013 Jun 4;158(11):807-20.
34. Clark, PJ., Thompson, AJ., Zhu, M. et al. Interleukin 28B polymorphisms are the only common genetic variants associated with low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in genotype-1 chronic hepatitis C and determine the association between LDL-C and treatment response. *J Viral Hepat.* 2012 May; 19(5):332-40.
35. Clark, PJ., Thompson, AJ., Vock, DM. et al. Hepatitis C virus selectively perturbs the distal cholesterol synthesis pathway in a genotype-specific manner. *Hepatology.* 2012 Jul;56(1):49-56
36. Corey, KE., Mendez-Navarro, J., Barlow, LL. et al. Acute hepatitis C infection lowers serum lipid levels. *J Viral Hepat.* 2011 Jul; 18(7):e366-71.

37. Corey, KE., Kane, E., Munroe, C. et al. Hepatitis C virus infection and its clearance alter circulating lipids: implications for long term follow-up. *Hepatology*. 2009 Oct; 50(4): 1030–1037.
38. de Gottardi, A., Paziienza, V., Pugnale, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Jan, 23(1):107-14.
39. de Lédinghen, V., Vergniol, J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol*. 2008 Sep; 32(6 Suppl 1):58-67.
40. Defilippis, AP., Blaha, MJ., Martin, SS. et al. Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013 Apr;227(2):429-36.
41. Dolganiuc, A., Norkina, O., Kodys, K. et al. Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology*. 2007 Nov; 133(5):1627-36.
42. EASL (European Association for the Study of the Liver) -EASD (European Association for the Study of Diabetes) –EASO (European Association for the Study of Obesity) Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016; 64(6):1388-402.
43. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2017 Jan; 66(1):153-194
44. Embade, N., Mariño, Z., Diercks, T. et al. Metabolic characterization of advanced liver fibrosis in HCV patients as studied by serum <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155094.
45. Fahey, S., Dempsey, E., Long, A. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cell Mol Immunol*. 2014 Jan;11(1):25-40
46. Farci, P., Wollenberg K., Diaz, G. et al. Profibrogenic chemokines and viral evolution predict rapid progression of hepatitis C to cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 4; 109(36): 14562–14567.
47. Fletcher, NF., Sutaria, R., Jo, J. et al. Activated macrophages promote hepatitis C virus entry in a tumor necrosis factor-dependent manner. *Hepatology*. 2014 Apr;59(4):1320-30.
48. Forns, X., Ampurdanès, S., Llovet, JM., et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002 Oct; 36(4 Pt 1):986-92.

49. Friedewald, W., Levi, R., Fredrickson, D. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499–502.
50. Fukuhara, T., Ono, C., Puig-Basagoiti, F. et al. Roles of lipoproteins and apolipoproteins in particle formation of hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 2015 Oct; 23(10):618-29.
51. Goossens, N., Negro, F. Cardiovascular Manifestations of Hepatitis C Virus. *Clin Liver Dis.* 2017 Aug; 21(3):465-473
52. Gopal, K., Johnson, TC., Gopal, S. et al. Correlation between beta-lipoprotein levels and outcome of hepatitis C treatment. *Hepatology.* 2006 Aug; 44(2):335-40.
53. Gordon, S., Lamerato, L., Rupp, L. et al. Prevalence of cirrhosis in hepatitis C patients in the Chronic Hepatitis Cohort Study (CHeCS): a retrospective and prospective observational study. *Am J Gastroenterol.* 2015 Aug; 110(8): 1169–1178.
54. Harris, C., Herker, E., Farese, RV Jr. et al. Hepatitis C virus core protein decreases lipid droplet turnover: a mechanism for core-induced steatosis. *J Biol Chem.* 2011 Dec 9; 286(49):42615-25.
55. Haukeland, JW., Damås, JK., Konopski, Z. et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2, *J Hepatol.* 2006 Jun;44(6):1167-74.
56. Heim, MH., Thimme, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol.* 2014 Nov; 61(1 Suppl):S14-25.
57. Hengst, J., Falk, CS., Schlaphoff, V. et al. Direct-acting antiviral-induced hepatitis C virus clearance does not completely restore the altered cytokine and chemokine milieu in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 2016 Dec 15;214(12):1965-1974.
58. Heydtmann, Mathis. Virus infections macrophages in hepatitis B and hepatitis C *J. Virol.* Apr 2009 Vol. 83, No. 7 pp.2796-2802
59. Heymann, F., Trautwein, C., Tacke, F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009 Sep;8(4):307-18.
60. Hilgendorf, I., Swirski, F., Robbins, C. et al. Monocyte Fate in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Feb; p 1-8.
61. Holmberg, S., Lu, M., Rupp, L. et al. Noninvasive serum fibrosis markers for screening and staging chronic hepatitis C virus patients in a large US cohort. *Clin Infect Dis.* 2013 Jul; 57(2): 240–246.

62. Hsu, CS., Liu, CH., Liu, CJ. et al. Association of metabolic profiles with hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients with genotype 1 or 2 infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010 May;25(5):970-7.
63. Hussain, M., Strickland, D., Bakillah, A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.* 1999. 19:141–72.
64. Iredale, J., Thompson, A., Henderson, N. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2013 Jul., Vol. 1832, (7), pp.876-883.
65. Irshad, Mohammad. Serum lipoprotein (a) levels in liver diseases caused by hepatitis. *Indian J Med Res.* 2004 Dec; 120(6):542-5.
66. Isoda, K., Folco, E., M.Reza Marwali MR. et al. Glycated LDL increases monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis Atherosclerosis. 2008 Jun; 198(2): 307–312.
67. Jackel-Cram, C., Babiuk, LA., Liu, Q. Up-regulation of fatty acid synthase promoter by hepatitis C virus core protein: genotype-3a core has a stronger effect than genotype-1b core. *J Hepatol.* 2007 Jun; 46(6):999-1008.
68. Jacobson, Terry. Lipoprotein(a), Cardiovascular Disease, and Contemporary Management, *Mayo Clin Proc.* 2013 Nov; 88(11):1294-311.
69. Janičko, M., Veselíny, E., Leško, D., et al. Serum cholesterol is a significant and independent mortality predictor in liver cirrhosis patients. *Ann Hepatol.* 2013 Jul-Aug; 12(4):581-7.
70. Kancheva, L., Nikolov, P., Velikova, T. et al. Soluble CD14 is associated with disease activity and severity in chronic viral hepatitis C and B. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences (Под печат)*
71. Kawaguchi, T., Ide, T., Taniguchi, E. et al. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol.* 2007 Mar; 102(3):570-6.
72. Kim, SU., Kim, JK., Park, NY. et al. Discordance between liver biopsy and Fibroscan® in assessing liver fibrosis in chronic hepatitis B: risk factors and influence of necroinflammation. *PLoS One.* 2012; 7(2): e32233.
73. Kleiner, DE., Makhlof, HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis.* 2016 May;20(2):293-312.

74. Krenkel, O., Tacke, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017 May; 17(5):306-321.
75. Kronenberg, F., Utermann, G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med.* 2013 Jan;273(1):6-30.
76. Lambert, JE., Bain, VG., Ryan, EA. et al. Elevated lipogenesis and diminished cholesterol synthesis in patients with hepatitis C viral infection compared to healthy humans. *Hepatology.* 2013 May; 57(5):1697-704.
77. Li, J., Gordon, SC., Rupp, LB. et al. The validity of serum markers for fibrosis staging in chronic hepatitis B and C. *J Viral Hepat.* 2014 Dec; 21(12):930-7.
78. Lin, Z., Xin, Y., Dong, Q. et al. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: An updated meta-analysis. *Hepatology* 2011 Mar, Vol.53, ( 3) pp.726–736.
79. Lonardo, A., Adinolfi, LE., Loria, P. Mechanisms of hepatitis C virus-induced fatty liver disease. *Hot Topics Viral Hep* 2009;5(14):23-28.
80. Lonardo, A., Adinolfi, LE., Restivo, L. et al. Pathogenesis and significance of hepatitis C virus steatosis: an update on survival strategy of a successful pathogen. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21; 20(23):7089-103.
81. Lonardo, A., Ballestri, S., Adinolfi, LE., et al. Hepatitis C virus-infected patients are 'spared' from the metabolic syndrome but not from insulin resistance. A comparative study of nonalcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus-related steatosis. *Can J Gastroenterol.* 2009 Apr;23(4):273-8.
82. Lonardo, A., Adinolfi, LE., Loria, P. et al. Steatosis and hepatitis C virus: Mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology.* 2004 Feb; 126(2):586-97.
83. Loria, P., Marchesini, G., Nascimbeni, F. et al. Cardiovascular risk, lipidemic phenotype and steatosis. A comparative analysis of cirrhotic and non-cirrhotic liver disease due to varying etiology. *Atherosclerosis.* 2014 Jan;232(1):99-109.
84. Lucidarme, D., Foucher, J., Le Bail, B. et al. Factors of accuracy of transient elastography (fibroscan) for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009 Apr;49(4):1083-9.
85. Malaguarnera, M., Giugno, I., Trovato, BA. et al. Lipoprotein(a) concentration in patients with chronic active hepatitis C before and after interferon treatment. *Clin Ther.* 1995 Jul-Aug;17(4):721-8.

86. Mangia, A., Ripoli, M., Insulin resistance, steatosis and hepatitis C virus. *Hepatol Int.* 2013 Dec; 7(Suppl 2): 782–789
87. Mann, JP., Anstee, QM. NAFLD: PNPLA3 and obesity: a synergistic relationship in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Sep; 14(9):506-507.
88. Marra, F., Aleffi, S., Galastri, S. et al. Mononuclear cells in liver fibrosis. *Semin Immunopathol.* 2009 Sep;31(3):345-58.
89. Marra, F., Tacke, F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology.* 2014 Sep; 147(3):577-594.e1.
90. Martinez, SM., Fernández-Varo, G., González, P. et al. Assessment of liver fibrosis before and after antiviral therapy by different serum marker panels in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Jan;33(1):138-48
91. Mateva, L., Antonov, K., Jeleu, D. et al. Non-alcoholic steatosis and chronic hepatitis C. I. Non-alcoholic steatosis and insulin. *J Clin Med.* 2009; 2(2):16-21
92. Matthews, D., Hosker J., Rudenski A. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985, 28 (7): 412–9.
93. McRae, S., Iqbal, J., Sarkar-Dutta, M. et al. The Hepatitis C Virus-induced NLRP3 Inflammasome Activates the Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) and Regulates Lipid Metabolism. *J Biol Chem.* 2016 Feb 12;291(7):3254-67
94. Messina, JP., Humphreys, I., Flaxman, A. et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology.* 2015 Jan; 61(1): 77–87.
95. Millonig, G., Friedrich, S., Adolf, S. et al. Liver stiffness is directly influenced by central venous pressure. *J Hepatol* 2010 Feb; 52(2):206-10.
96. Millonig, G., Reimann, FM., Friedrich, S. et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology.* 2008 Nov;48(5):1718-23.
97. Milner, KL., van der Poorten, D., Trenell, M. et al. Chronic hepatitis c is associated with peripheral rather than hepatic insulin resistance. *Gastroenterology.* 2010 Mar;138(3):932-41.e1-3.
98. Mirandola, S., Realdon, S., Iqbal, J. et al. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology.* 2006 May;130(6):1661-9.
99. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 2007 Sep;9(9):1089-97.

100. Moorman, AC., Xing, J., Ko, S. et al. Late diagnosis of hepatitis C virus infection in the Chronic Hepatitis Cohort Study (CHeCS): Missed opportunities for intervention. *Hepatology*. 2015 May; 61(5):1479-84.
101. Moreau, M., Rivière, B., Vegna, S. Hepatitis C viral proteins perturb metabolic liver zonation. *J Hepatol*. 2015 Feb;62(2):278-85.
102. Moucari, R., Asselah, T., Cazals-Hatem, D. et al. Insulin resistance in chronic hepatitis c: association with genotypes 1 and 4, serum hcv rna level, and liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):416-23.
103. Mueller, S., Sandrin, L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepat Med*. 2010; 2: 49–67.
104. Myers, RP., Crotty, P., Pomier-Layrargues, G. et al. Prevalence, risk factors and causes of discordance in fibrosis staging by transient elastography and liver biopsy. *Liver Int*. 2010 Nov;30(10):1471-80.
105. Myers, RP., Pomier-Layrargues, G., Kirsch, R. et al. Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology*. 2012 Jan; 55(1):199-208.
106. Nagano, T., Seki, N., Tomita, Y. et al. Impact of chronic hepatitis C virus genotype 1b infection on triglyceride concentration in serum lipoprotein fractions. *Int J Mol Sci*. 2015 Aug;16(9):20576-94.
107. Negro, F., Forton, D., Craxi, A. et al. Extrahepatic morbidity and mortality of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2015 Nov; 149(6):1345–1360.
108. Neufeldt, C., Joyce, M., Van Buuren, N. et al. The hepatitis C virus-induced membranous web and associated nuclear transport machinery limit access of pattern recognition receptors to viral replication sites. *PLoS Pathog*. 2016 Feb; 12(2): e1005428.
109. Nishimura, M., Yamamoto, H., Yoshida, T. et al. Decreases in the serum VLDL-TG/non-VLDL-TG ratio from early stages of chronic hepatitis C: alterations in TG-rich lipoprotein levels. *PLoS One*. 2011 Feb 25; 6(2):e17309.
110. Nishitani, N., Sakakibara, H. Association between body mass index and high-sensitivity C-reactive protein in male Japanese. *Obes Res Clin Pract*. 2013 Jul-Aug;7(4):e297-300.
111. Nordestgaard, BG., Chapman, MJ., Ray, K. et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010 Dec;31(23):2844-53.

112. Ohira, T., Schreiner, PJ., Morrisett, JD. et al. Lipoprotein(a) and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke*. 2006 Jun;37(6):1407-12.
113. Oliveira, CP., Kappel, CR., Siqueira, ER. et al. Effects of hepatitis C virus on cardiovascular risk in infected patients: a comparative study. *Int J Cardiol*. 2013 Apr 5;164(2):221-6.
114. Palmer C, Corpuz, T., Guirguis, M. et al. The effect of obesity on intrahepatic cytokine and chemokine expression in chronic hepatitis C infection. *Gut*. 2010 Mar;59(3):397-404.
115. Panee, Jun. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine*. 2012 Oct;60(1):1-12.
116. Paradis, V., Perlemuter, G., Bonvoust, F. et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2001 Oct, 34 (4 Pt 1):738-44.
117. Patel, K., Remlinger, K., Walker, T. et al. Multiplex protein analysis to determine fibrosis stage and progression in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Dec; 12(12): 2113–2120.e3.
118. Patel, S., Jinjuvadia, R., Patel, R. et al. Insulin resistance is associated with significant liver fibrosis in chronic hepatitis C patients: A systemic review and meta-analysis. *J Clin Gastroenterol*. 2016 Jan;50(1):80-4.
119. Pedersen, MR., Patel, A., Backstedt, D. et al. Genotype specific peripheral lipid profile changes with hepatitis C therapy. *World J Gastroenterol*. 2016 Dec 14; 22(46): 10226–10231
120. Pellicoro, A., Aucott, R., Ramachandran, P. et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology* 2012 June, Vol.55, (6), pp.1965–1975.
121. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, JP. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014 Mar; 14(3):181-94.
122. Perticone, M., Miceli, S., Maio, R. et al. Chronic HCV infection increases cardiac left ventricular mass index in normotensive patients. *J Hepatol*. 2014 Oct; 61(4):755-60.
123. Petit, JM., Benichou, M., Duvillard, L. et al. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol*. 2003 May;98(5):1150-4.

124. PetruzzIELlo, A., Marigliano, S., Loquercio, G et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016 Sep 14; 22(34):7824-40.
125. Petta, S., Maida, M., Macaluso, FS. et al. Hepatitis C virus infection is associated with increased cardiovascular mortality: a meta-analysis of observational studies. *Gastroenterology.* 2016 Jan;150(1):145-155.e4; quiz e15-6.
126. Petta, S., Torres, D., Fazio, G. et al. Carotid atherosclerosis and chronic hepatitis C: a prospective study of risk associations. *Hepatology.* 2012 May;55(5):1317-23.
127. Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J et al. Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut.* 2017 Aug; 66(8):1487-1495.
128. Ramcharran, D., Wahed, AS., Conjeevaram, HS. et al. Serum lipids and their associations with viral levels and liver disease severity in a treatment-naïve chronic hepatitis C type 1-infected cohort. *J Viral Hepat.* 2011 Apr; 18(4):e144-52.
129. Rembeck, K., Maglio, C., Lagging, M. PNPLA 3 I148M genetic variant associates with insulin resistance and baseline viral load in HCV genotype 2 but not in genotype 3 infection. *BMC Med Genet.* 2012; 13: 82.
130. Revie, D., Salahuddin, SZ. Role of macrophages and monocytes in hepatitis C virus infections *World J Gastroenterol.* 2014 Mar 21; 20(11): 2777–2784.
131. Sato, C., Saito, T., Misawa, K. et al. Impaired mitochondrial  $\beta$ -oxidation in patients with chronic hepatitis C: relation with viral load and insulin resistance. *BMC Gastroenterol.* 2013; 13: 112.
132. Satoh, K., Nagano, T., Seki, N. et al. Level of serum cholesteryl ester transfer protein in active hepatitis C virus infection. *World J Hepatol.* 2016 Feb 18; 8(5):291-300.
133. Schleicher, J., Tokarski, C., Marbach, E. et al. Zonation of hepatic fatty acid metabolism—The diversity of its regulation and the benefit of modeling. *Biochim Biophys Acta.* 2015 May;1851(5):641-56.
134. Schmidt, J., Blum, H., Thimme, R. T-cell responses in hepatitis B and C virus infection: similarities and differences. *Emerg Microbes Infect.* 2013 Mar; 2(3): e15.
135. Sebastiani, G., Halfon, P., Castera, L. et al. Comparison of three algorithms of non-invasive markers of fibrosis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Jan;35(1):92-104.
136. Serfaty, Lawrence. Metabolic manifestations of hepatitis C virus: diabetes mellitus, dyslipidemia. *Clin Liver Dis.* 2017 Aug; 21(3):475-486.

137. Shinohara, Y., Imajo, K., Yoneda, M. et al. Hepatic triglyceride lipase plays an essential role in changing the lipid metabolism in genotype 1b hepatitis C virus replicon cells and hepatitis C patients. *Hepatol Res.* 2013 Nov; 43(11):1190-8.
138. Siagris, D., Christofidou, M., Theocharis, GJ. et al. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. *J Viral Hepat.* 2006 Jan;13(1):56-61.
139. Sica, A., Invernizzi, P., Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 2014 May, Vol.59, (5), pp2034–2042.
140. Soo, HM., Garzino-Demo, A., Hong, W. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of cc Chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology.* 2002 Nov 25;303(2):253-77.
141. Stender, S., Kozlitina, J., Nordestgaard, BG. et al. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. *Nat Genet.* 2017 Jun; 49(6):842-847.
142. Sud, A., Hui, JM., Farrell, GC. et al. Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology.* 2004 May;39(5):1239-47.
143. Svegliati-Baroni, G., Faraci, G., Fabris, L. et al. Insulin resistance and necroinflammation drives ductular reaction and epithelial-mesenchymal transition in chronic hepatitis C. *Gut.* 2011 Jan;60(1):108-15.
144. Syed, GH., Tang, H., Khan, M. et al. Hepatitis C virus stimulates low-density lipoprotein receptor expression to facilitate viral propagation. *J Virol.* 2014 Mar;88(5):2519-29.
145. Tacke, Frank. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5 (Suppl 1): S27.
146. Targher, G., Day, CP., Bonora, E. et al. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med,* 363, 2010, 14, 1341-50.
147. Tateya S, Tamori, Y., Kawaguchi, T. et al. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. *Endocrinology.* 2010 Mar;151(3):971-9.
148. Teng, B., Burant, C., Davidson, N. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 1993, Vol. 260, (5115), pp. 1816-1819.
149. The International Classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI, Global Database on Body Mass Index. World Health Organization. 2006.

150. Thompson AJ, Patel, K., Chuang, WL. Viral clearance is associated with improved insulin resistance in genotype 1 chronic hepatitis C but not genotype 2/3. *Gut*. 2012 Jan;61(1):128-34.
151. Tillmann HL, Patel, K., Muir, AJ. et al. Beneficial IL28B genotype associated with lower frequency of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2011 Dec;55(6):1195-200.
152. Toma, L., Stancu, CS., Botez, GM. et al. Irreversibly glycosylated LDL induce oxidative and inflammatory state in human endothelial cells; added effect of high glucose. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 18;390(3):877-82.
153. Tsimikas, Sotirios. A test in context: lipoprotein(a): diagnosis, prognosis, controversies, and emerging therapies. *JACC*, 2017 Feb, Vol. 69, No.6, 2017:692 –711.
154. Valenti, L., Rumi, M., Galmozzi, E. et al. Patatin-Like phospholipase domain containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C *Hepatology*. 2011 Mar;53(3):791-9.
155. Valkov, I., Ivanova, R., Marinova, C. et al. A comparative analysis of serum lipids in patients with chronic hepatitis C, nonalcoholic fatty liver disease and healthy controls. *Acta Medica Bulgarica* 2017, Vol. XLIV, No 1, 5-10.
156. 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 Jul;46(1):32-6.
157. Van Thiel, DH., George, M., Attar, BM. et al. Plasma triglyceride levels may modulate hepatitis C viral replication. *Dig Dis Sci*. 2014 Apr;59(4):881-5.
158. Vanni, E., Abate, ML., Rizzetto, M. et al. Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2009 Sep;50(3):697-706.
159. Varela, LM., Ortega, A., Bermudez, B. et al. A high-fat meal promotes lipid-load and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in circulating monocytes. *Am J Clin Nutr*. 2011 May, Vol. 93, No.5, 918-925.
160. Vogt, DA., Camus, G., Herker, E. et al.. Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog*. 2013 Apr; 9(4): e1003302.
161. Vonghia, L., Magrone, T., Verrijken, A. et al. Peripheral and hepatic vein cytokine levels in correlation with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-related metabolic, histological, and haemodynamic features *PLoS One*. 2015 Nov 24;10(11):e0143380.

162. Wang, Y., van der Tuin, S., Tjeerdema, N. et al. Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells. *Hepatology*. 2015 Dec; 62(6):1710-22.
163. Wasmuth, HE., Tacke, F., Trautwein, C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010 Aug;30(3):215-25.
164. White, DL, Ratziu, V., El-Serag, HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2008 Nov; 49(5):831-44.
165. Wieland, S., Makowska, Z., Campana, B. et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology*. 2014 Jun;59(6):2121-30.
166. Wiesner, P., Tafelmeier, M., Chittka, D. et al. MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma *J Lipid Res*. 2013 Jul; 54(7):1877-83.
167. World Health Organization / International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a consultation, 2006.
168. Yang, MH., Son, HJ., Sung, JD. et al. The relationship between apolipoprotein E polymorphism, lipoprotein (a) and fatty liver disease. *Hepatogastroenterology*. 2005 Nov-Dec;52(66):1832-5.
169. Younossi, ZM., Stepanova, M., Estep, M. et al. Dysregulation of distal cholesterol biosynthesis in association with relapse and advanced disease in CHC genotype 2 and 3 treated with sofosbuvir and ribavirin. *J Hepatol*. 2016 Jan;64(1):29-36.
170. Zaitoun, A., Al, M., Awad, S. et al. Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol*. 2001 Jun; 54(6): 461–465.
171. Zampino, R., Coppola, N., Cirillo, G. et al. Abdominal fat interacts with PNPLA3 I148M, but not with the APOC3 variant in the pathogenesis of liver steatosis in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2013 Aug;20(8):517-23.
172. Ziol, M., Handra-Luca, A., Kettaneh, A. et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005 Jan;41(1):48-54.

## **XI. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ**

### **Статии**

Valkov, I., Ivanova, R., Alexiev, A., Antonov, K., Mateva, L. Association of serum lipids with hepatic steatosis, stage of liver fibrosis and viral load in chronic hepatitis C. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017 Aug, Vol. 11, 15-20.

Valkov, I., Ivanova, R., Marinova, C., Alexiev, A., Antonov, K., Jeleu, D., Ivanova, R.S., Mateva, L. A comparative analysis of serum lipids in patients with chronic hepatitis C, nonalcoholic fatty liver disease and healthy controls. *Acta Medica Bulgarica* 2017, Vol. XLIV, № 1, 5-10.

Вълков, Иван. Хроничен хепатит С - вирусна инфекция асоциирана с липидната обмяна. *Българска хепатогастроентерология*, Бр 2, 2016г, 40-44.

Антонов, К., Вълков, И., Попов, Д., Алексиев, А. Fibroscan за оценка на чернодробната фиброза при пациенти с хронични HBV и HCV инфекции. *Българска хепатогастроентерология*. Бр. 2, 2014г, 28-32.

Kancheva, L., Nikolov, P., Velikova, T., Valkov, I., Nikolov, R., Mateva, L. Soluble CD14 is associated with disease activity and severity in chronic viral hepatitis C and B. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* (Под печат)

Участия в международни научни форуми и научни съобщения.

I. Valkov, T. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir, D. Kyurkchiev, K. Antonov. Monocyte chemoattractant protein -1 concentrations in serum depend on overweight in chronic hepatitis C patients and increase after sustained virologic response. 25<sup>th</sup> UEG Week Барселона, Испания, 28.10.-01.11.2017, постер с награда National Scholar Award.

I. Valkov, R. Ivanova, A. Alexiev, K. Antonov, L. Mateva. Association of serum lipids with fatty liver, stage of fibrosis and viral load in chronic hepatitis C. 1<sup>st</sup> International Conference on Fatty Liver. Севилья, Испания 1-3.06.2017 г.

R. Ivanova, I. Valkov, Tz. Marinova, A. Alexiev, K. Antonov, L. Mateva. Cardiometabolic risk factors and carotid intima media thickness in patients with chronic hepatitis C. *Atherosclerosis*. 2017 Aug. Vol. 263, e267.

R. Ivanova, I. Valkov, C. Marinova, A. Alexiev, K. Antonov, D. Jeleв, L. Mateva. Comparative analysis of serum lipids in patients with chronic hepatitis C, nonalcoholic fatty liver disease, and healthy controls. *Atherosclerosis*. 2016 Sep. Vol. 252, e154–e155.

I. Valkov, C. Marinova, A. Alexiev, K. Antonov, D. Jeleв, R. Ivanova, L. Mateva. Comparative analysis of serum lipids in patients with chronic hepatitis C and B, nonalcoholic fatty liver disease, and healthy controls. *EASL Monothematic conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD*. Инсбрук, Австрия 26-28.02.2015 г.

## **XII. ПРИЗНАТЕЛНОСТ**

Благодарни сме на

Доц. Доброслав Кюркчиев, Д-р Цветелина Великова и екипа на Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски”, за помощта при обработката на серумните проби и изследването на МСР-1 по метода на количествен ELISA.

Д-р Ирена Иванова и екипа на Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св. Иван Рилски” за за помощта при обработката на серумните проби, изследването на Lp(a) по проект и други клинично-лабораторните показатели.

Съвет по медицинска наука към Медицински университет – София за полученото финансиране по програма „Млад изследовател” ДОГОВОР №14-Д/2014 г по проект „Роля на серумните липиди във вирусната кинетика, патогенезата и терапевтичния отговор на хроничната HCV инфекция. Проследяване и съпоставяне на липидния статус с клинични, образни, лабораторни, вирусологични и хистологични методи за оценка на чернодробното заболяване”.