

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ  
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ  
КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ  
УМБАЛ „СВ. ИВАН РИЛСКИ”**

**ОЦЕНКА НА БАКТЕРИАЛНАТА ТРАНСЛОКАЦИЯ  
ПРИ БОЛНИ С ХРОНИЧНИ ВИРУСНИ ХЕПАТИТИ С И В**

Дисертационен труд за присъждане на научна степен „Доктор” на  
д-р Людмила Владимирова Кънчева

Научна специалност – Гастроентерология

Научен ръководител  
Проф. д-р Росен Кирилов Николов, дмн

София, 2017

## ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

### *На кирилица:*

АЛТ – аланин аминотрансфераза  
АСТ – аспартат аминотрансфераза  
БТ – бактериална транслокация  
ГГТ – гама-глутамил трансфераза  
Декомп. Ци – декомпенсирана цироза  
ЕКГ – електрокардиография  
ИР – инсулинова резистентност  
ИФН – Интерферон  
ЛПЗ – липополизахарид  
Неусл. Ци – неусложнена цироза  
НР – нон-респондъри на специфична противовирусна терапия за хепатит С  
Общ бил. – общ билирубин  
СЧБ – сляпа чернодробна биопсия  
ТБСР – тънкочревен бактериален свръхрастеж  
ТВО – траен вирусологичен отговор

### *На латиница:*

APRI-скор – AST to Platelet Ratio скор  
BMI – индекс на телесната маса  
ELISA – ензим-свързан имуносорбентен анализ  
HBV – инфекция с хроничен хепатит В  
HBV DNA – хепатит В вирусна ДНК  
HCC – хепатоцелуларен карцином  
HCV – инфекция с хроничен хепатит С  
HCV RNA – хепатит С вирусна РНК  
НОМА-IR – Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance  
hsCRP – високочувствителен С-реактивен протеин  
INR – International Normalized Ratio  
mCD14 – мембранна форма на cluster of differentiation 14 (CD14)  
NUC – нуклеозиден/нуклеотиден аналог  
sCD14 – soluble cluster of differentiation 14 (разтворим CD14)  
TLR-4 – toll-like receptor 4  
TNF-a – тумор-некрозис фактор алфа

## СЪДЪРЖАНИЕ

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1   | ВЪВЕДЕНИЕ .....   | 4  |
| 2   | ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....  | 27 |
| 2.1 | Цел .....   | 27 |
| 2.2 | Задачи .....  | 27 |
| 3   | МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....   | 28 |
| 3.1 | Изследвани лица.....  | 28 |
| 3.2 | Използвани методи .....   | 32 |
| 3.3 | Статистическа обработка на резултатите .....  | 34 |
| 4   | РЕЗУЛТАТИ.....  | 36 |
| 4.1 | Изследване на серумни нива на ЛПЗ при пациенти с хронична С и В вирусна инфекция и здрави контроли.....                                       | 42 |
| 4.2 | Оценка на връзката на sCD14 с фиброзата и тежестта на чернодробното заболяване .....  | 44 |
| 4.3 | Оценка на връзката на sCD14 с хистологичната активност и маркерите за чернодробно и системно възпаление при хронична инфекция с хепатит С и В | 64 |
| 4.4 | Оценка на sCD14 във връзка с терапевтичния отговор при хепатит С инфекция, показанията за терапия при хепатит В инфекция .....                | 75 |
| 4.5 | Оценка на серумните нива sCD14 при някои усложнения на чернодробната цироза.....  | 84 |
| 5   | ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....   | 88 |
| 6   | ИЗВОДИ .....  | 93 |
| 7   | ПРИНОСИ .....   | 94 |
| 8   | ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....  | 95 |
| 9   | БИБЛИОГРАФИЯ .....  | 96 |

## 1 ВЪВЕДЕНИЕ

Хроничните хепатити С и В са социално значим здравен проблем, свързани са с повишена болестност, риск за развитие на чернодробна цироза и хепатоцелуларен карцином. Наличието на високоефективна терапия за хепатит С инфекцията намалява, но не премахва риска за развитие на късни усложнения на болестта при чернодробна цироза – НСС, декомпенсация, което налага активно проследяване на тези болни [117,165]

Бактериалната транслокация (БТ) представлява преминаване от чревния лумен в мезентериалните лимфни възли на чревни бактерии или техни продукти (липополизахарид, пептидогликани, мурамил дипептидази, бактериална ДНК). Бактериалната транслокация е увеличена при чернодробна цироза с всякаква етиология и способства за развитие на усложнения на болестта като спонтанен бактериален перитонит, хепато-ренален синдром, портална енцефалопатия. Проучва се ролята на БТ в патогенезата на метаболитни нарушения като инсулинова резистентност и диабет, затлъстяване, неалкохолен стеатохепатит. Установена е патогенетична роля в иницирането и прогресията на канцерогенезата в различни органи, вкл. черния дроб. Доказана е ролята на БТ за прогресията на чернодробната фиброза.

### *Бактериалният ЛПЗ – разпознаване и имунен отговор в организма*

Бактериалният липополизахарид (ЛПЗ) съставляват външната обвивка на Грам-отрицателните бактерии. Преминал в кръвообращението, дори в малки дози, има способността да индуцира мощен възпалителен отговор. Правилно регулираният имунен отговор към преминали в кръвообращението бактериални продукти води до благоприятни ефекти за организма – привличане на левкоцити към мястото на инфекцията, активиране на ефекторни механизми за убиване и

очистване от бактериите. Позитивно регулиран или преекспониран имунният отговор може да доведе до имуносупресия, вторични инфекции, нерегулиран възпалителен отговор с последващ тежък сепсис, шок и смърт. Затова организмът еволюционно е развил механизми за контролиране на степента, навременността и локализацията на имунния отговор към бактериални продукти. Механизмите за разпознаване на ЛПЗ на Грам-отрицателните бактерии са сред най-чувствителните в организма и упражняват контрол върху ЛПЗ-медираната имунна активация чрез вътреклетъчни ефекти (развитието на толеранс и синтеза на противовъзпалителни цитокини) или извънклетъчни процеси (плазмените липопротеини и инхибиторни ЛПЗ-свързващи пептиди).

ЛПЗ се разпознават главно от toll-like receptor 4 (TLR-4), експресиран от периферните моноцити и макрофаги, както и от резидентните макрофаги в черния дроб – Купферовите клетки. За осъществяването на биологичните им ефекти са необходими три допълнителни молекули – MD-2, cluster of differentiation 14 (CD-14), липополизахарид свързващ протеин (lipopolysaccharide binding protein – LBP). Интересно е, че пептидите разпознаващи ЛПЗ и опосредствяващи ефектите му в организма също проявяват инхибиторен ефект и помагат за лимитирането на взаимодействието на ЛПЗ с MD-2/TLR4 – рецепторния комплекс. [67, 85, 114]

TLR-4, заедно със секреторния протеин MD-2, който увеличава мембранната му експресия, и мембранната форма на CD14 (mCD14) образуват рецепторен комплекс по повърхността на моноцитите и макрофагите. Свързването на ЛПЗ към TLR-4/MD-2/mCD-14-комплекса води до рецепторна димеризация и активиране на две алтернативни цитокинови каскади – MyD88-зависима и TRIF-зависима. Първата е свързана с активиране на митоген активирани протеин-кинази (MAPK) и нуклеарен фактор-капа В (NF-κB), с последващ възпалителен цитокинов отговор (вкл. тумор некрозис фактор алфа (TNF-α), интерлевкин (IL)-1, 6, 8) и резистентност на апоптоза. Втората каскада

изисква вътреклетъчно разпознаване на ЛПЗ и е свързана със синтез на интерферон бета, противовъзпалителни цитокини и клетъчна апоптоза. Двата пътя взаимно се модулират. [1]

Крайният ефект на ЛПЗ върху имунния отговор зависи от концентрацията ЛПЗ и времето на експозиция, както и от допълнителните протеини – LBP и sCD-14. [74, 92] В много ниски концентрации ЛПЗ води до персистиращо минимално възпалително състояние в организма, докато във високи дози води до кратка самоограничаваща се остра възпалителна реакция. Последваща стимулация с ЛПЗ води до рефрактерност (толеранс) на TLR към лиганда и липса на имунен отговор. Този толеранс профилактира срещу развитието на неконтролируема свръхстимулация на имунната система и системен възпалителен отговор. [40]

Разпознаването на ЛПЗ от TLR-4 на Купферовите клетки води до синтез на провъзпалителни цитокини (вкл. TNF-a, IL-1, 6, 8, 18) и реактивни кислородни радикали, неутрофилен хемотаксис и тромбоцитната агрегация в чернодробните синусоиди с последваща хепатоцитна некроза. Купферовите клетки синтезират трансформиращ растежен фактор бета (TGF-b), който активира чернодробните звездовидни клетки (HSC) към фиброгенеза. Последните също експресират TLR-4, при свързването с който ЛПЗ могат директно да ги очувствят към TGF-b, както и да ги направят резистентни на апоптоза. [84, 144, 148] Su и съавтори установяват, че генетично променени мишки с дефицит на CD14 са нечувствителни към ЛПЗ, като реактивността им към цели бактерии остава интактна. Те постулират, че експресията на CD14 може да е подлежащият механизъм, определящ чувствителността на черния дроб към токсичните ефекти на ЛПЗ.

Липополизахарид-свързващият протеин (LBP) и разтворимата форма на CD14 (sCD14) са острофазови протеини, съответно от първи и втори тип, с роля за ЛПЗ-медираните ефекти в организма. [18] LBP се синтезира в черния дроб в

отговор на провъзпалителни цитокини и ЛПЗ. Той мономеризира ЛПЗ след транслокацията му в кръвообращението, свързва липид А – частта от ЛПЗ отговорна за токсичните му ефекти – и опосредства взаимодействието му с TLR-4/MD-2/mCD14-комплекса. [60, 109]

Cluster of differentiation 14 (CD14) е маркер на диференциация, експресиран по повърхността на моноцити, макрофаги и гранулоцити. Разтворимата форма (sCD14) се синтезира чрез протеазно отделяне от mCD14, чрез директно освобождаване от вътреклетъчни отдели на периферните моноцити [21, 44], както и чрез хепатоцитна синтеза [18, 109] в отговор на ЛПЗ-транслокация. Заедно с LBP, sCD14 свързва и представя ЛПЗ на TLR4/MD2/mCD14-комплекса. [91] Двата белтъка също могат да представят ЛПЗ на плазмените липопротеини (главно HDL), което води до неутрализирането им. Ефектите им зависят от концентрацията им и от етапа на инфекцията. [92]

В ранните етапи на инфекцията и в ниски концентрации LBP опосредства взаимодействието с рецептора и активирането на имунните клетки – механизъм за почистване от бактериалните продукти. Във високи концентрации неутрализира свързаните ЛПЗ като ги представя на плазмените липиди (главно HDL) за елиминирането им. [92, 69] sCD14 осъществява равновесно състояние между mCD14 и HDL, като във високи концентрации отнема ЛПЗ от мембранната форма и ги представя на HDL – по този начин намалява ЛПЗ-индуцираните ефекти върху клетките, експресиращи mCD14. [91, 177] sCD14 също участва в отговора към ЛПЗ от клетки в извънсъдовите компартменти, които не експресират mCD14, където предизвиква провъзпалителен отговор и почистване на ЛПЗ. Контролирането на отговора към ЛПЗ от циркулиращите моноцити ограничава системната токсичност на ЛПЗ, като в същото време позволява възпалението да продължи на локално тъканно ниво. [73, 91, 92, 138]

Доказана е ролята на бактериалната транслокация за развитието на усложнения на цирозата – спонтанен бактериален перитонит, портална енцефалопатия, хепато-ренален синдром. [93] Също е уточнена ролята на ЛПЗ-индуцираното минимално системно възпаление за прогресията на алкохолната и неалкохолна стеатозна болест. [70, 104, 110, 113, 129, 143, 171] Активно се проучва и ролята на ЛПЗ за прогресията на хроничните вирусни хепатити В и С. Изследването на ЛПЗ е трудоемко поради краткия им полуживот и наличието в серума на инхибиторни протеини. От друга страна е установено, че не самото наличие на ЛПЗ, а предизвиканият от тях имунен отговор корелира с тежестта на чернодробното заболяване. Затова LBP и sCD14 се използват като маркери за бактериална експозиция, както и за имунен отговор предизвикан от ЛПЗ. [91]

#### *Причини за повишената БТ при цироза.*

Порталната хипертония лежи в основата на повечето усложнения на чернодробната цироза. Бактериалните инфекции са причина за значима болестност и смъртност, като са свързани с около 4 пъти по-голяма смъртност при циротиците. Голяма част от инфекциите са причинени от Грам-отрицателни чревни бактерии, най-вече Ентеробактерии. [11, 22, 56]

Тънкочревният бактериален свръхрастеж (ТБСР) се определя като повече от  $10^5$  колония-формиращи единици на милилитър съдържимо от проксималния йеюлум. Наблюдаваната честота на тънкочревен бактериален свръхрастеж е между 48 и 73%, особено при напреднала болест, предходен епизод на спонтанен бактериален перитонит или портална енцефалопатия. [87] При напреднала цироза ТБСР е един от основните фактори, благоприятстващи бактериалната транслокация, развитието на СБП и ендотоксемия. В експериментални модели е демонстрирано, че при липса на ТБСР бактериална транслокация се явава сравнително рядко – в 0-11%. Също така е установено, че

само около половината животни с бактериален свръхрастеж развиват бактериална транслокация, което говори, че свръхрастежът е предразполагащ, но не и достатъчен фактор за появата на бактериална транслокация. Развитието на SIBO при цироза се приписва на намаления тънчочревен мотилитет и интестиналното транзитно време [167], приема на инхибитори на протонната помпа [161], хипо- и ахлорхидрията при цироза.

Свръхрастежът донякъде се благоприятства от забавения чревен пасаж. Оро-цекалното транзитно време и резидентното време в тънкото черво (свързано с промени в продължителността на миграция моторен комплекс, както и в последодателността на контракциите са значимо удължени при циротици с спрямо пациенти без ТБСР. Забавеният чревен пасаж най-вероятно е с многофакторна генеза: автономна невропатия, метаболитни нарушения, диабетни усложнения [13, 15, 163]. Самият тънчочревен свръхрастеж води до забавяне на пилоро-цекалното транзитно време при цироза, като последното се подобрява от антибиотична терапия. [173] Нарушенията в тънчочревния мотилитет са по-изразени при пациенти с епизод на спонтанен бактериален перитонит. В няколко експериментални модела е установено ускоряване на чревния пасаж от Пропранолол, а с това и намаление на бактериалния свръхрастеж и транслокация, което може да профилактира развитието на спонтанен бактериален перитонит. [136, 150]

При цироза са описани структурни нарушения в целостта на чревната лигавица – разширени междуклетъчни пространства, венозна и лимфна съдова конгестия с оток на спланхниковата тъкан, фибромускулна пролиферация, намалено съотношение вили/крипти, задебеление на ламина мускуларис мукозе. Тези промени водят до повишен чревен пермеабилитет. [136] Епителните клетки показват намалена трансцелуларна резистентност под стрес, с повишено трансцелуларно преминаване на бактериални продукти. В добавка е нарушена целостта на плътните връзки в началните отдели на тънкото черво при циротици

(с намалена експресия на оклудин и клаудин-1), което повишава и парацелуларната пропускливост за макромолекули, вкл. ЛПЗ. [12] При експериментални модели най-изразени са хистологичните промени в цекума, но като че ли с най-голямо значение за появата на патологична бактериална транслокация е тънкочревният бактериален свръхрастеж. В експериментален модел е установен благотворен ефект от приема на прокинетики (Цизаприд) върху йеюналната флора, но не върху флората в цекума. Спланхниковата свръхпродукция на азотен оксид също допринася за нарушената цялост на чревния епител, дилатира плътните връзки в клетъчни култури, намалява синтеза на АТФ – в резултат увеличава чревната пропускливост. Наблюдавана е намалена смъртност и липса на бактериална транслокация при мишки без гена за iNOS. Малнутрицията при цироза допринася за повишената пропускливост и бактериална транслокация [122], а и мукозните епителни клетки възприемат коменсалните бактерии като патогенни което е свързано с повишен възпалителен отговор.

Мезентериалните лимфни възли играят ключова роля при транслокация на коменсални бактерии. Тези бактерии се неутрализират без предизвикване на системна възпалителна реакция. В експериментален модел с хирургично отстранени лимфни възли дендритните клетки, натоварени с чревни бактерии достигат до слезката, където стимулират специфичен имунен отговор. Имуносупресията при хора и в експериментални модели предразполага към системна дисеминация на транслокирани бактерии и в крайна сметка към сепсис и смърт. Относителният дефицит на вродения и придобит имунитет при цироза водят до намален капацитет за хемотаксис, опсонизация, фагоцитоза на мононуклеарите, нарушената активност на ретикуло-ендотелната система благоприятстват бактериалната транслокация.

При цироза е нарушен и синтезът и на някои съединения с антибактериални свойства. В експериментален модел на циротичен асцит и

бактериална транслокация е наблюдаван намален синтез на алфа-дефензини от клетките на Панет в тънкото черво 3 (не се наблюдава при липса на бактериална транслокация). Описаната промяна няма връзка с тежестта на порталната хипертония. Придружена е с намалена ин витро антибактериална активност към различни щамове Ентеробактерии. Жлъчните киселини имат трофичен ефект върху мукозата, намаляват интернализацията на чревни бактерии, проявяват детергентно и антиадхерентно действие, неутрализират ендотоксините. Намаленият им синтез и повишена деконюгация от чревни бактерии при цироза с ТБСР благоприятства бактериалната транслокация. Наблюдаван е и благоприятен ефект от оралния прием на жлъчни киселини върху бактериалния свръхрастеж. [1] Описана е намалена фекална концентрация и намалена мукозна секреция на IgA в йеюнума, което може да допринася за развитието на инфекции при цироза.

Наблюдава се нарастване в степента на бактериалната транслокация с увеличаване тежестта на чернодробното заболяване.[137] Патологичната транслокация на жизнеспособни бактерии в мезентериалните лимфни възли е феномен, характерен за декомпенсирания стадий на заболяването. В експериментални модели на цироза БТ се развива само при наличие на асцит [88]. Тези данни съответстват на установените повишени нива на LBP и повишен пермеабилитет при цироза с асцит [182], но не и без асцит, в сравнение със здрави контроли. Нарастването на ТБСР в хода на чернодробното заболяване достига до 80% при напреднала цироза с асцит [127]. Също така е наблюдавано пропорционално на Чайлд-скора ниво на ЛПЗ в кръвообращението. Повишени нива на култивируеми бактерии се наблюдават при Чайлд С 30% в сравнение с чайлд А 3% и В 8%. Чайлд-скорът е независим предиктор на патологична бактериална транслокация. Наличие на бактериална ДНК и ЛПЗ се открива в мезентериалните лимфни възли и в преасцитния стадий [87], като нивата на бактериална ДНК в системното кръвообращение не

корелират с тежестта на чернодробното заболяване. Това сочи към различен механизъм на траслокация на ДНК и живи бактерии при цироза.

Роля за БТ има и порто-системното шънтиране, характерно за напредналите стадии на заболяването. Поради порто-системно шънтиране се наблюдава намален чернодробен клирънс на чревни бактерии и бактериални продукти от порталната циркулация. [9]

Освен промените във връзка с порталната хипертония за цирозата са характерни и придобити нарушения във вродения и придобития имунен отговор, което допълнително благоприятства БТ и затруднява очистването от бактериалните продукти.

По отношение на вродения имунитет при цироза са установени промени в TLR, които може да се дължат на продължителната експозиция на бактерии, техните продукти и PAMPs при БТ. Наблюдавана е негативна регулация на TLR2 от HBeAg при В вирусна инфекция, която се премахва след сероконверсия. Авторите предполагат роля на намалената експресия на TLR2 за бързата прогресия на чернодробната болест при HBeAg позитивните пациенти. [164] Дисфункцията на TLR2 и TLR4 е един от главните рискови фактори за развитие на инфекция при цироза. [132, 133] Промени в първия рецептор са характерни за ранните стадии на цирозата, а на втория – само в напредналите стадии. [101, 162, 175] Описан е повишен риск за развитие на спонтанен бактериален перитонит, инфекции и бактериемия при някои полиморфизми TLR2,4 и NOD2 – и трите дефекта свързани с намалени нива на NFκB и на провъзпалителни цитокини.

Наблюдавано е нарушение в моноцитната функция при цироза сходно с имунната парализа при остра върху хронична чернодробна недостатъчност и септичен шок 16. Последната се характеризира с намалена експресия на HLA-DR по повърхността на моноцитите с последващ повишен синтез на

противовъзпалителни цитокини (IL-6 и 10) и намален на провъзпалителни (IL-1, TNF-a). [101, 107, 175] Ендотоксемията при циротици допринася за потискането на HLA-DR експресията, вероятно по IL-10 медиран механизъм. [101] Тези моноцити показват дефекти в хемотаксиса, фагоцитозата, NOS-активността и синтезата на лизозомни ензими. Също при хронични чернодробни заболявания е описан повишен дял на неklasическия тип моноцити CD14+CD16+, което корелира с трансформацията на звездовидните клетки в миофибробласти, експресията на провъзпалителни цитокини и клиничната прогресия на чернодробното заболяване [83].

Във връзка с нарушеното почистване на провъзпалителни цитокини в черния дроб и БТ при цироза се наблюдава продължителна стимулация на неутрофилите с последващо нарушение в миграцията и фагоцитарната им активност. Наблюдавана е корелация на серумните нива на sCD163, маркер за активация на макрофагите [174], с Чайлд-скора, с градиента на венозното налягане и наличието на портална хипертония. sCD163, чрез синтеза на азотен оксид и ангиогенни пептиди допринася за повишен риск за кървене от варици на хранопровода и за развитието на спонтанен бактериален перитонит при цироза. Ин витро отстраняването на цитокините и намаляването на нивото на ендотоксемията чрез пробиотици подобрява функцията на полиморфонуклеарните левкоцити при цироза.

При чернодробна цироза са чести и различни нарушения в придобития имунитет. Намалена е популацията на паметовите В-клетки [41] както и Т-клетъчната популация. Първото намалява адаптивния имуен отговор към транслокирани бактериални продукти, второто води до транслокация и системна дисеминация на коменсални бактерии като E. коли [102]. Дефицитът на Т-клетки също води до натрупване на бактерии в мезентериалните лимфни възли и системна дисеминация при експериментални модели на алкохолно чернодробно увреждане. Наблюдавано е и намалено съотношение на Th1/Th2 лимфоцитите

при цироза. Първите експресират антифибротични, а вторите – профибротични цитокини, в резултат на което при цироза се промотира фиброгенезата. [181, 152] Повишеното желязно отлагане при напреднала чернодробна цироза е свързано с нарушен Th1 отговор, нарушена функция на макрофагите и неутрофилите. Също така води и до нарастване на числеността на CD8+ и намаление на CD4+ Т-клетките, както и отговора към банални антигени. Повишава и податливостта на организма към микроорганизми като *E. coli*, *Vibrio* и *Listeria monocytogenes*. [168]

Системата на комплемента играе важна роля във вродения и придобития имунитет. Хепатоцитите са основно място на синтез на факторите на комплемента. При цироза е наблюдавана намалена опсонизираща активност и нива на C3, което повишава податливостта на инфекции. Наблюдаван е намален синтез и повишен разход на факторите на комплемента поради продължителна му активация. Факторите на комплемента участват активно във фиброгенезата – установена е повишена експресия на рецептора за C5a по повърхността на звездовидните клетки при трансформацията им в миофибробласти, както и важна роля на C3a и C5a в чернодробната регенерация.

При цироза са описани количествени и качествени промени в чревната флора. Наблюдавани са промени в съотношението *Bacteroides/Fermitutes* с намаление числеността на *Bacteroidetes*, също и на Клостридии, както и нарастване в популацията на Протеобактерия, основно Ентеробактериацие [28], също на Стрептококи и Фузобактериацие [14], Вајај и съавтори 48, Chen и съавтори 25, 147. Намалението на Клостридиите в частност е свързано с изразена провъзпалителна активност и корелира негативно с Чайлд-скора. Lu, Xu Wu и съавтори демонстрират и намаляване на съотношението *Bifidobacteria/Enterobacteriaceae* с напредване на чернодробното заболяване. Промените във флората водят до нарушена имунна хомеостаза, благоприятстват развитието на бактериална транслокация и допринасят за нарушената защита на

организма срещу бактериалните продукти и развитието на бактериални усложнения на цирозата като енцефалопатия, СБП и кървене от варици [63]. Увеличената синтеза на TNF-алфа и IL6 при цироза в отговор на бактериална транслокация повишава степента на бактериална транслокация, което затваря порочен кръг.

Серумните нива на нитрити и нитрати, отговорни за хипердинамичното състояние при цироза корелират с ендотоксемията. Плазмените нива на IL-6 корелират негативно със системната съдова резистентност, но не с нивата на ЛПЗ. ЛПЗ водят до бъбречна вазоконстрикция в експериментални модели. [79] Установена е повишена бъбречна експресия на TLR4, NFκB, TNF-α в експериментална цироза, което е свързано с повишена чувствителност към ЛПЗ, което може да се избегне със селективна деконтаминация. [89] Пациентите с тежка циротична кардиомиопатия имат по-високи нива на LBP, които корелират с диастолната дисфункция. [90] Ендотоксиновите нива корелират с тежестта на порталната хипертония и с нивата на sTNF-aR при алкохолна цироза с TIPS. Ендотоксемията също може да бъде предизвикващ фактор за кървене от варици чрез влошаване на чернодробната функция, както и чрез остро повишение в порталното налягане 24. При пациенти с портална енцефалопатия е установен различен състав на фекалната флора от здрави индивиди. [14, 16] Установена е силна връзка на някои бактериални щамове (*Alcaligeneseae*, *Porphyromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*) с когнитивната функция и системното възпаление при портална енцефалопатия. Има силни данни, доказващи подпомагаща роля на възпалението (към ефекта на амониевите съединения) за неврологичното обостряне при портална енцефалопатия. Стерилното възпаление, предизвикано от бактериална транслокация предизвиква имунна дисфункция и чрез синтезираните провъзпалителни медиатори директно оказва въздействие върху мозъка. [31, 38] Развитието на ХРС тип1 е свързано със сърдечната систолна функция. [94] В добавка към миокардната дисфункция освобождаването на ендотоксин и биологично активни субстанции (възпалителни цитокини, азотен

оксид) допълнително могат да нарушат сърдечната функция при напреднала цирроза. [95, 97]

### *Маркери за БТ при хронични вирусни хепатити В и С.*

Описани са повишени серумни нива на sCD14 при хронични хепатити В и С [108, 120, 156] с по-високи стойности при напреднала фиброза и цирроза. Повишените нива по-скоро се дължат на възпаление, отколкото на нарушено очистване от черния дроб при напреднало заболяване, тъй като дори болни без чернодробна цирроза имат значимо по-висок sCD14 в сравнение със здрави контроли. Възможна е и връзка с нарушената чревна бариера при по-тежка портална хипертония. Meuleman и съавт. показват в експериментален модел, че вирусите нямат директен ефект върху синтеза на sCD14 от хепатоцитите – което вероятно означава, че при болни с хронични вирусни хепатити sCD14 се синтезира основно от активираните периферни моноцити. [109, 156]

При пациенти с хроничен хепатит С Dolganiuc и съавт. показват, че Интерферон гама, ЛПЗ и С-вирусният кор протеин модулират моноцитите и Купферовите клетки към загуба на toll-like-рецепторния толеранс и повишен синтез на TNF-а. Моноцити от пациенти с хепатит С синтезират значимо повече TNF-а базално и при стимулация с лиганди на TLR-2 и 4 в сравнение с контролни индивиди (поради загуба на хомо- и хетеротолеранс към ЛПЗ). Това е допълнителен механизъм за персистиране на имунно-медираното възпаление при болни с хроничен хепатит С. С него биха могли да се обяснят по-високите нива на sCD14 при хепатит С в сравнение с хепатит В, описани от някои автори. [42]

В много елегантно изследване Sandler и съавтори показват връзка на sCD14 с активността и тежестта на чернодробното заболяване при хепатит В и С инфекция. [108, 142] Изследвани са I-FABP – маркер за ентероцитна некроза,

ЛПЗ – маркер за бактериална транслокация, sCD14 – маркер за имунна активация в отговор към ЛПЗ и IL-6 – маркер за чернодробно възпаление и регенерация. Авторите описват повишение на всички маркери при пациентите с хепатит В и С инфекция в сравнение със здрави контроли. Но само за sCD14 установяват корелация с маркери за чернодробно възпаление (NAI-хистологичния индекс, цитолитичните ензими, феритина) и фиброза (APRI-скора и директния билирубин). При пациенти с напреднала фиброза показват по-високи серумни нива на sCD14 и повече sCD14-позитивни Купферови клетки в черния дроб в сравнение с пациенти с минимална фиброза. [42, 157] Същевременно не наблюдават разлика между пациенти без фиброза и здрави контроли. Авторите описват повишена степен на ентероцитна некроза при напреднала фиброза и липса на разлика между пациенти без фиброза и здрави контроли. След успешна противовирусна терапия за хепатит С описват значим спад в степента на ентероцитната некроза и чернодробното възпаление (намаление на нивата на I-FABP и IL-6). Макар и при двата вида хепатити се наблюдава бактериална транслокация, по-значимата имунна активация в отговор на ЛПЗ корелира с чернодробното възпаление и отдиференцира пациентите с напреднала фиброза. Други автори [123, 156] също описват предиктивна роля на по-високите серумни нива на sCD14 за прогресия на заболяването и лош изход при пациенти с хронична С и В вирусна инфекция, независимо от други маркери за възпаление, фиброза и прогресия (такава връзка не е установена за I-FABP и ЛПЗ). [156]

### *Връзка с отговора към интерфероново лечение при хроничен хепатит С.*

Описани са по-ниски изходни нива на LBP [123] или sCD14 [108] при пациенти с ТВО в сравнение с нон-респондъри и рилапсъри. Sandler и съавтори интерпретират връзката между високите нива на sCD14 и липсата на отговор към интерфероново лечение с наличието на по-напреднала фиброза при тези болни. [108] Интерферонът е активиращ цитокин, който стимулира моноцитите към освобождаване на sCD14 и Купферовите клетки към експресия на mCD14. Така на фона на интерферонова терапия е описана или липса на динамика, или повишаване на нивата на sCD14 и LBP [25, 86, 108], при намаляваща чернодробна възпалителна активност. Nieп и съавтори описват спад на LBP след успешна противовирусна терапия (интерферонов и безинтерферонов режим), както при нециротици, така и при пациенти с чернодробна цироза. [120]

### *Инсулинова резистентност и С вирусна инфекция.*

Хепатит С и захарният диабет тип 2 са силно свързани. С вирусната инфекция повишава риска за развитие на диабет около 11 пъти в сравнение с индивиди без HCV, особено при наличие на съпътстващи рискови фактори като затлъстяване, възраст над 65 години. [102] Наблюдавана е и по-висока честота на ЗД 2 спрямо пациенти с В вирусна инфекция (OR 1.9). С инфекцията предизвиква чернодробно възпаление и повишен синтез на провъзпалителни цитокини, които заедно с HCV кор-протеина водят до нарушена инсулинова сигнализация в хепатоцитите. С напредване на болестта последната преминава и на системно ниво. [7, 17, 57, 170]

Захарният диабет от своя страна повишава за заразяване с С вируса (OR 3.5), вероятно поради по-честите инвазивни процедури при тези пациенти. [4, 68, 71] Инсулиновата резистентност допринася за по-бърза прогресия на фиброзата и увеличена чернодробна смъртност при хепатит С инфекция.

НОМА-индексът корелира негативно с терапевтичния отговор на фона на интерферонов режим, като наличието на ИР е свързано с 20% по-нисък ТВО независимо от генотипа. [37] ИР също корелира с настъпването на инфекциозни усложнения на цирозата преживяемостта [46, 80, 155] и възникването на НСС (pooled risk ratio 2.5 за развитие на НСС при цироза с всякаква етиология). [41, 45] При добър контрол на диабета с НvA1c под 7 % рискът за НСС намалява, което сочи хепатит С и диабета като синергични рискови фактори за НСС. [10]

След постигане на ТВО се наблюдава подобрене в инсулиновата чувствителност в сравнение с нон-респондъри на терапия. Намалява честотата на де ново възникнала ИР и на развитието на диабетни усложнения (сърдечно-съдови и бъбречни). Освен това с постигането на ТВО намаляват честотата на възникване на НСС, чернодробната и обща смъртност. Подобрене по отношение на ИР се наблюдава и при успешна безинтерференова терапия. [6, 36, 51, 61, 77, 128, 140, 153, 171]

Наличният захарен диабет и дори нарушеният глюкозен толеранс са свързани с персистиращ риск за развитие на НСС след постигане на ТВО. Наличието на цироза и генотип 3 също са рискови фактори за карциногенеза след изчистване на вируса. [48, 169] Дори при пациенти с нискостепенна фиброза нарушеният глюкозен толеранс е свързан с HR 3.8 за развитие на хепатоцелуларен карцином спрямо общата популация. Тези данни сочат, че противовирусната терапия трябва да бъде започната рано – преди появата на глюкозни метаболитни нарушения. [78]

Първи Сани и съавтори [23] показват в експериментален модел, че високомастната диета предизвиква затлъстяване и инсулинова резистентност, придружени от високи нива на ЛПЗ и възпалителни маркери (TNF-а, IL-1 и IL-6) в кръвообращението. Свързвайки се с TLR4, ЛПЗ предизвиква провъзпалителен отговор, което представя връзката между диетата, микрофлората и метаболитните болести. [2, 24, 66, 143, 167] Разширено метагеномно проучване

показва сходни промени в микрофлората при пациенти с преддиабетно и диабетно състояние [20]. Наблюдава се намаление на популацията на някои бутират-продуциращи бактерии и нарастване на някои опортюнистични патогени. Повишените плазмени нива на ЛПЗ са свързани с нискостепенно възпаление [143], медирано чрез TLR4. Установена е негативна корелация на ЛПЗ нива с мускулната инсулинова чувствителност при пациенти с диабет и затлъстяване. Третирането на клетъчни линии от човешки мускулни клетки с ЛПЗ води до експресия на провъзпалителни маркери (моноцит хемотактен протеин 1 – MCP-1 и IL-6), както и до намаление на инсулин-стимулиращи фактори. При TLR4-/- мишки се наблюдават по-ниски нива на възпалителни цитокини като TNF-а и IL-6 и са протекция срещу инсулинова резистентност, което подчертава, че възпалението оказва ефект върху метаболизма [111,112]. Потискането на TLR4 намалява възпалителния отговор и подобрява инсулиновата чувствителност. В заключение високите нива на провъзпалителни фактори като ЛПЗ са свързани с потискане на инсулиновата сигнализация в няколко тъкани, което може да доведе до инсулинова резистентност при хронични заболявания. [100]

Мишки без PRRs nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1) or TLR4 са протектирани от бактериална транслокация. Последната може да се предотврати чрез терапия с пробиотик *V. animalis*, който подобрява общия възпалителен и метаболитен статус на животните. Резултатите от това изследване показват, че бактериалната транслокация се появява преди началото на метаболитните болести и е интегрална част от патогенезата им. [50, 55]

Метагеномни проучвания сочат, че въпреки големите разлики в състава на микрофлората между здравите индивиди, чревният метагеном (наборът от всички гени на чревната флора) участва в ключови функции, като смилане и разграждане на несмилаеми нутриенти, както и роля за развитието и

стимулирането на имунната система. [75] Микроорганизмите също произвеждат фармакологично активни сигнални молекули, повлияващи метаболизма [119]. Например късоверижните мастни киселини се синтезират от ферментацията на неразградими фибри от чревните бактерии. Взаимодействието им с G-протеин сдвоените рецептори повлиява инсулиновата чувствителност в адипоцитите и периферните органи, като по този начин се повлиява енергийния метаболизъм [147] Промени, настъпващи в чревната флора, могат да нарушат симбиозата между организма и микрофлората с развитие на нискостепенно възпаление, метаболитни нарушения, увеличено отлагане на липиди, загуба на инсулинова чувствителност. [118] Развитието на инсулинова резистентност води до нарушена гликемия на гладно, повишен липиден синтез в черния дроб, дислипидемия, хипертония и натрупване на мастна тъкан (метаболитен синдром). [35] Тези метаболитни нарушения са свързани и с активация на имунната система.[64]

Чревната флора подпомага енергийния внос от иначе несмилаеми хранителни източници и допринасят за повишено мастно натрупване в организма. [141]. Чрез спомагане в диференциацията на чревния епител, повишаване плътността на капилярите в микровилите, повлияване на чревния мотилитет флората съдейства за повишено извличане на калории от диетата. [116] Чревната флора води до негативна регулация на чревната експресия на FIAF (fasting-induced adipose factor), който потиска активността на липопротеинлипазата в мастната тъкан и благоприятства натрупването на триглицериди в адипоцитите (FIAF активира разпадането на триацилглицерола от липопротеините до мастни киселини, които да се използват като енергиен източник от мускулите и мастната тъкан). Чревните бактерии също потискат освобождаването на аденозин монофосфат-активирана протеин киназа (AMPK), експресирана основно в скелетната мускулатура, мозъка и черния дроб в отговор на метаболитен стрес (хипоксия, хипогликемия, физическа активност), което намалява митохондриалното окисление на мастни киселини, кетогенеза,

секрецията на инсулин и поемането на глюкоза от клетките, и увеличава липогенезата и синтеза на холестерол и ТГ. [141, 160] Чрез синтеза на късоверижни мастни киселини, които са лиганд за G-протеин сдвоените рецептори (GPCR-41,43,109A) по повърхността на чревните ентерохромафинни клетки с действие върху чревната и панкреасна ендокринна функция. Свързването на киселините с рецепторите стимулира синтеза на пептид YY, който променя чревния мотилитет и увеличава абсорбцията на нутриенти. GPR43 също намалява натрупването на масти, намалява инсулиновата чувствителност в мастната тъкан, и я увеличава в черния дроб и мускулите. [119] Чрез него синтезираните от микрофлората късоверижни мастни киселини влияят на адаптивния чревен имунитет.

При пациенти със затлъстяване и диабет са установени по-ниски нива на бифидобактерии и *F. prausnitzii*, които са Грам-положителни притежаващи противовъзпалителни свойства. Това е съпроводено с повишени възпалителни маркери, както и с нарушен глюкозен и липиден метаболизъм. Чревните бактерии могат да доведат до развитие на инсулинова резистентност чрез индуциране на провъзпалително състояние в организма и синтез на SCFA. [141]

Установена е ролята на sCD14 и LBP за развитието на периферна и чернодробна инсулинова резистентност, както и връзката им със затлъстяването, дислипидемията и развитието на неалкохолен стеатохепатит. [34, 39, 53, 54, 126] Не е проучена в детайли връзката между маркерите и инсулиновата резистентност при пациенти с хепатит С, където по-принцип последната се среща в до 80 % и играе роля за прогресията на заболяването и канцерогенния риск. [130] При пациенти с хроничен хепатит С Nien и съавтори описват повишени нива на LBP, които свързват от една страна с метаболитни маркери като гликемия и затлъстяване, а от друга – с хепатит С инфекцията и чернодробното възпаление. Те описват LBP като маркер за хепатит С инфекция,

както и за неинфекционно възпаление в организма при хроничен хепатит С. [120]

*Връзка с маркери за хепатит В инфекция.*

Steyaert и съавтори описват негативна корелация между серумните нива на sCD14 и количеството HBsAg, като такава връзка не се наблюдава с HBV DNA. Авторите предполагат евентуална ин виво супресия на моноцитите и Купферовите клетки от HBsAg. [156]

*Връзка с развитието на хепатоцелуларен карцином (HCC).*

HCC е третото по смъртност раково заболяване по света [49, 62, 105] Основни рискови фактори са хепатит С и В инфекциите и предизвиканата от тях цирроза. 80-90 % от пациентите с HCC имат чернодробна цирроза. Пет годишният кумулативен риск за развитие на HCC при цирроза е между 5 и 30 %. [26, 105] Активно се проучва ролята на бактериалната транслокация за карциногенезата, както и методи за превенция.

Хроничното възпаление е ключов фактор за карциногенезата в органи като стомах, дебело черво, бял и черен дроб. [65] 80% от случаите на хепатоцелуларен карцином се развиват в микросреда на хронично чернодробно увреждане, възпаление и фиброза. Транслокацията на бактерии и техните патоген-асоциирани молекулни последователности (PAMPs) е обичайна при хронично чернодробно увреждане [145] и благоприятства развитието на чернодробно възпаление и фиброза чрез активиране на TLR4. [148] В експериментални модели продължителното третиране с ниски дози ЛПЗ значимо увеличава честотата на развитие на HCC. От друга страна генетичната

инактивация на TLR4, стерилизацията на червата и germ-free статусът намаляват честотата на развитие на НСС с 80%.

В експериментален модел на НСС с DEN и CCl<sub>4</sub> (модел отразяващ няколко характеристики на циротичната микросреда, в която се развива НСС. Darito и съавтори показват, че чревната микрофлора и ЛПЗ/TLR4 пътят играят роля за инициране на НСС при хронично чернодробно увреждане. Това се случва чрез повишаване експресията на епирегулин хепатомитоген. Последният активира епидермалния растежен фактор в ранните стадии на DEN/CCl<sub>4</sub> индуцираната карциногенеза, с последваща транслокация на NF-κB в ядрото и намаляване на хепатоцитната апоптоза. Така TLR4 може да е свързващото звено между чревната флора, възпалението и карциногенезата в хронично увредения черен дроб. Продължителното приложение на ниски дози ЛПЗ увеличава размера и броя тумори, докато при мишки със стерилизирани черва се наблюдавали по-ниски нива на ЛПЗ и по-нисък туморен растеж. [43, 148, 178]

Оста черва-черен дроб е важен фактор, допринасящ в патогенезата на НСС. [139, 146] Чрез порталния кръвоток бактериални продукти (ЛПЗ, бактериална ДНК и пептидогликан) достигат черния дроб. Бактериалният ендотоксин допринася за прогресията на хроничните вирусни хепатити – чрез TLR-4 индуцирана фиброгенеза и развитието на циротични усложнения – СБП, ЧЕ, ХРС. [179] TLR диференциално се активират от коменсалните бактерии [125] и индуцират сигнални пътища, отговарящи за чревната хомеостаза, регулацията на плътните връзки и секрецията на антимикробни пептиди. Транслокацията на патоген-асоциирани молекулни последователности (PAMPs) и микробно-асоциирани молекулни последователности (MAMPs – ЛПЗ, пептидогликан, флагелин) от коменсалните и патогенните чревни бактерии предизвиква възпалителен отговор чрез TLR. Количеството им в кръвообращението корелира с тежестта на чернодробната болест и с наличието

на чревна дисбиоза. В експериментални модели мишки без бактерии и третирани с нерезорбируеми антибиотици са с намалено чернодробно възпаление, фиброза и протектирани от НСС. От друга страна третирането с ЛПЗ увеличава честотата на развитие на НСС. [115] Cirea и съавтори [29] показват, че транслокацията на бактериални продукти в мезентериалните лимфни възли е увеличена при пациенти с напреднала цироза и достига нива като при пациенти без цироза след селективна чревна деконтаминация.

Хроничната чернодробна болест също оказва ефект върху чревната хомеостаза, което води до дисбиоза и повишен чревен пермеабилитет. Zhang и съавтори показват значимо повишени серумни ендотоксинови нива при пациенти с цироза и НСС. [180] В модел с плъхове, подложени на DEN хроничното чернодробно увреждане е придружено от дисбаланс на чревната флора и тъканна увреда на чревния епител. Приложението на пробиотици драматично подобрява чревната дисбиоза и чревното възпаление и най-вече намалява туморния растеж в черния дроб. В упоменатото по-горе изследване на Darito авторите постулират, че чревната стерилизация би могла да предотврати развитието на НСС при пациенти с хронична чернодробна болест. Подобна превентивна стратегия при пациенти с цироза би изисквала доживотно приложение на антибиотици. Що се отнася до молекулярните механизми на канцерогенезата в черния дроб е доказано, че звездовидните, Купферовите клетки и хепатоцитите са чувствителни на ЛПЗ чрез TLR4. [33, 43] Важно откритие на Darito и съавтори, е че хепатокарциногенезата при хронично чернодробно увреждане зависи от чревната микрофлора и активацията на TLR4 в non-bone-marrow-derived resident liver cells, вкл. хепатоцити и звездовидни клетки. Това откритие се различава от данните на Yu и съавтори, които установяват че Купферовите клетки са основните таргетни клетки за ЛПЗ/TLR4 сигнализацията в черния дроб и играят важна роля в индуцирането на синтезата на TNF $\alpha$  и IL-6. Деактивирането на Купферовите клетки води до значимо

намаление на цитокиновия синтез и комплементарната пролиферация в отговор на DEN. [178]

Li и съавтори установяват значимо по-високи стойности на sCD14 при пациенти с хепатит В в сравнение със здрави контроли, като нивата са най-високи в групата с НСС. Установяват по-висока чувствителност на sCD14 като маркер за НСС в сравнение с алфа-фетопротеина, както и значим спад в стойностите на sCD14 след резекция на НСС. В многофакторен регресионен модел установяват, че високите нива на sCD14 са лош прогностичен маркер за преживяемост при тези болни. В заключение отдават роля на sCD14 в патогенезата на хепатоцелуларния карцином. [99] По-стари изследвания не показват разлика при пациенти с НСС. [156]

## **2 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **2.1 Цел**

Оценка на бактериалната транслокация при болни с хронични вирусни хепатити С и В и връзката ѝ с хода на заболяването.

### **2.2 Задачи**

1. Да изследваме маркери за бактериална транслокация (LPS, sCD14) при пациенти с хронична С и В вирусна инфекция и да ги сравним със здрави контроли.
2. Да оценим връзката на маркерите за бактериална транслокация със стадия на фиброзата и тежестта на чернодробното заболяване при пациентите с вирусна С и В инфекция.
3. Да оценим връзката на маркерите за бактериална транслокация с показатели за чернодробна и системна възпалителна активност при хронична инфекция с хепатит С и В.
4. Да оценим връзката на маркерите за бактериална транслокация с терапевтичния отговор при хепатит С инфекция и с показанията за терапия при хроничен вирусен хепатит В.
5. Да оценим връзката между маркерите за бактериалната транслокация и развитието на тежки усложнения на чернодробната цироза с С и В вирусна етиология.

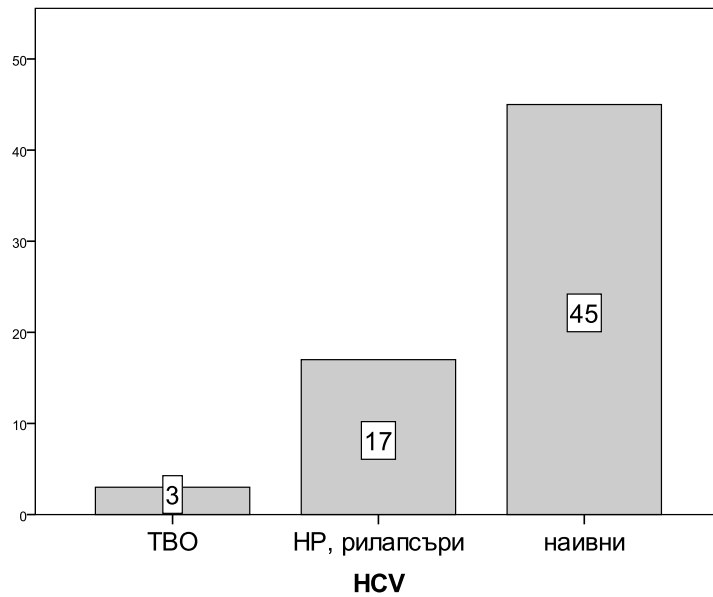
### **3 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **3.1 Изследвани лица**

Изследваха се данните от общо 119 лица, изследвани и лекувани в Клиника по гастроентерология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски”, МУ София за периода май 2014 г до септември 2016 г., разделени в следните групи:

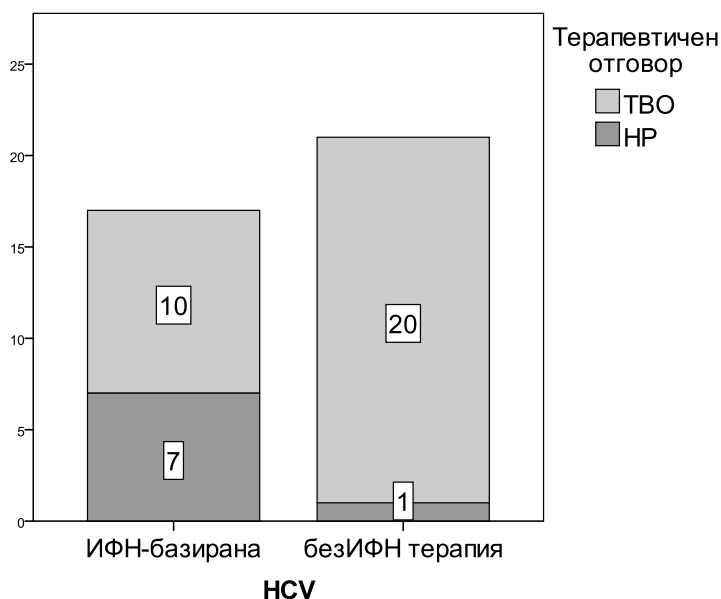
**I група** – 65 пациенти с хроничен хепатит С – 37 жени и 28 мъже, от 19 до 85 години, средна възраст  $49.6 \pm 14.3$  г. Болестта беше хистологично верифицирана при 28 пациента, 34 имаха доказана чернодробна цироза без проведена биопсия, при 4 пациента биопсия не се проведе поради противопоказания за лечение с Интерферон (единствената опция за терапия по НЗОК през 2014 г).

3 пациента бяха с ТВО 2 години след проведено интерфероново лечение, 17 бяха нон-респондъри на предишно интерфероново лечение, останалите 45 пациенти бяха наивни. (фиг. 1)



Фиг. 1 Изходен терапевтичен статус на болните с HCV

За периода на проследяване 2.5 години при 38 пациента (11 от нон-респондърите и 27 от наивните болни) се проведе специфично противовирусно лечение. 30 от тях постигнаха траен вирусологичен отговор – 10 пациента без цироза с Интерферон-базирана терапия (двойна, тройна, Пегасис+Копегус+Совалди) и 20 пациента с цироза с безинтерфероново лечение. 8 пациента не отговориха на терапията – 7 бяха нон-респондъри или релапсъри след Интерферон-базирана терапия, 1 пациентка с цироза беше нон-респондър след безинтерфероново лечение. (фиг. 2)



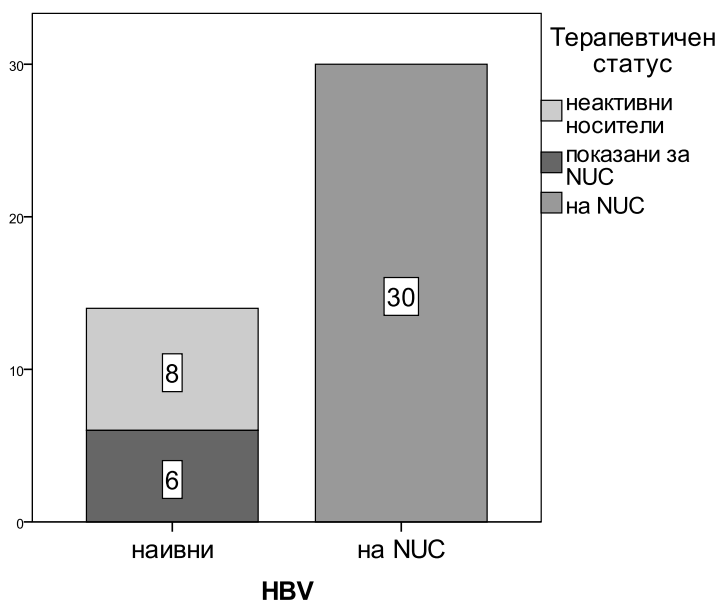
Фиг. 2 Терапевтичен отговор при пациентите с HCV

6 от пациентите имаха хепатоцелуларен карцином. Двама от тях бяха Чайлд А, трима – Чайлд В, а един пациент – Чайлд С. Трима пациенти имаха едно огнище с размер до 3 см, двама бяха с мултифокален НСС, 1 пациентка беше след проведена чернодробна резекция.

**II група** – 44 пациенти с хроничен хепатит В – 11 жени и 33 мъже, от 22 до 68 години, средна възраст  $50.4 \pm 12.5$  г. Болестта беше хистологично верифицирана при 21 пациента, 17 имаха доказана чернодробна цироза без проведена биопсия, 6 бяха носители на хепатит В с нормални чернодробни ензими и виремия под 2000 UI/ml и при тях биопсия не се проведе.

14 от пациентите бяха наивни, останалите 30 – на терапия с нуклеоз(т)идни аналози – от тях 26 бяха с негативна виремия и 4 с позитивна виремия. (фиг. 3)

За периода от 2.5 г при 6 от наивните пациенти се започна терапия с нуклеоз(т)иден аналог, останалите 8 нямаха показания за започване на терапия и продължиха да се проследяват. (фиг. 3)



Фиг. 3 Терапевтичен статус на болните с HBV

**III група** – 10 здрави доброволци с негативни маркери за хепатит В и С (HBsAg, anti HBc total, anti HCV) и с нормални чернодробни ензими. При тях еднократно се изследваха чернодробни ензими, високочувствителен С-реактивен протеин, sCD14, кръвна захар и инсулин на гладно.

Разпределението на участниците по пол, възраст и наличие или не на цирроза е представено на табл. 1.

Табл. 1 Разпределение по пол, възраст и наличие на чернодробна цирроза в отделните групи

|          | N  | Жени | Мъже | Възраст     | Цирроза |
|----------|----|------|------|-------------|---------|
| HCV      | 66 | 38   | 28   | 49.6 ± 14.3 | 37      |
| HBV      | 44 | 11   | 33   | 50.4 ± 12.5 | 17      |
| контроли | 10 | 8    | 2    | 31.6 ± 4    |         |

### 3.2 Използвани методи

- Анамнеза
- Физикален статус, демографски данни, вкл. индекс на телесната маса (BMI = телесно тегло/р<sup>2</sup>)
- 12-канален ЕКГ-запис
- Абдоминална ехография – конвенционално и Доплер изследване
- Специализирани изследвания
  - 1) Молекулярно-биологична техника – real-time PCR за количествено определяне на HCV RNA и HBV DNA
  - 2) ELISA – техника на принципа на количествено измерване на антиген/антитяло комплекса по стандартна крива – за изследване на липополизахариди (LPS) и разтворим CD14 (sCD14)
  - 3) Турбидиметричен метод – за определяне на hsCRP
- Стандартни лабораторни методи – за определяне на серумни нива на АСТ, АЛТ, ГГТ, общ и директен билирубин, албумин, INR, тромбоцитен брой

Диагнозата на чернодробните заболявания е поставена по съответните стандартни критерии, изградена на базата на анамнестични, физикални, изобразителни, инструментални, хистологични, лабораторни, имунологични, серологични, молекулярно-биологични и др. специализирани изследвания, съвместими със съответната диагноза.

Фиброзата се оцени ехографски при всички болни. Хистологична оценка на фиброзата се проведе по МЕТАВИР като A0-4 отразява степента на хистологична активност, а F0-4 – стадия на фиброзата, F0-1 се прие за липсваща или минимална фиброза, F<sub>≥</sub>2 се прие за клинично значима фиброза, F<sub>≥</sub>3 – за напреднала фиброза. При всички болни се проведе неинвазивна оценка на фиброзата чрез изчисляване на APRI-скор (АСТ/тромбоцитен брой). При 10 пациенти с С вирусна инфекция и чернодробна цироза допълнително се проведе оценка на фиброзата и хистологичната активност чрез неинвазивен метод –

FibroTest с изследване на следните биомаркери – алфа2-макроглобулин, хаптоглобин, аполипопротеин А1, билирубин, ГГТ, АСТ, АЛТ, глюкоза на гладно, общ холестерол и триглицериди.

В групата с хепатит С инфекция болестта се верифицира хистологично при 27 болни, 34 имаха клинични, инструментални и лабораторни данни за чернодробна цироза и при тях биопсия не се проведе, при 4 пациенти без данни за чернодробна цироза не се проведе чернодробна биопсия поради наличие на противопоказания за интерференово лечение (единствената опция за терапия по НЗОК през 2014 г в България).

В групата с хепатит В инфекция болестта беше верифицирана хистологично при 21 болни, 17 имаха клинични, инструментални и лабораторни данни за чернодробна цироза и при тях биопсия не се проведе, а 6 пациенти не бяха биопсирани, тъй като бяха оценени като неактивни носители на В вируса.

Пациентите с чернодробна цироза се оцениха чрез изчисляване на Child-скор (на базата на серумни нива на общ билирубин, албумин, INR, наличието на асцит и портална енцефалопатия) и MELD-скор (на базата на креатинин, билирубин и INR). Порталната хипертония се оцени ехографски при всички болни. При 33/35 от циротиците с С вирусна инфекция и 15/17 от циротиците с В вирусна инфекция се проведе и гастроскопия с оценка на варици на хранопровода. Пациентите се разпределиха по групи и във връзка с това, дали болестта е неусложнена, с наличие на варици на хранопровода или с настоящ или предшествващ епизод на декомпенсация (епизод на асцит, кръвоизлив от варици на хранопровода, епизод на портална енцефалопатия, епизод на хепаторенален синдром, наличие на хепатоцелуларен карцином).

Инсулиновата резистентност оценихме чрез изчисляване на HOMA-IR индекса (homeostasis model assessment of insulin resistance, = глюкоза на гладно х инсулин/22.5). Като инсулинова резистентност приехме стойности над 2. Оценка на инсулинова резистентност проведохме при 51 от пациентите с С вирусна

инфекция, както и при всички пациенти с В вирусна инфекция и всички здрави контроли.

Промените в телесната маса изчислихме на базата на индекс на телесната маса ( $\text{BMI} = \text{телесно тегло} / \text{ръст}^2$ ) според отклоненията в BMI по Класификацията на СЗО за телесното тегло (WHO, 1999). Като наднормено тегло или затлъстяване приехме стойности на BMI над 25. Данни за индекс на телесната маса имаше за 45 от пациентите с С вирусна инфекция, 40 от пациентите с В вирусна инфекция, при здравите контроли. При останалите болни липсваха данни или имаше наличен асцит.

Бактериалната транслокация оценихме чрез изследване на серумни нива на ЛПЗ с *ELISA Kit for Lipopolysaccharide, Cloud-Clone corp., No. CEB526Ge, с линеен обхват 12.35-1000 ng/ml*. Изследването проведохме при 11 пациенти с хронична С вирусна инфекция (2 от тях с цироза), 11 пациенти с В вирусна инфекция (3 с цироза) и 4 здрави контроли.

Като втори маркер за бактериална транслокация, както и за имунна активация от преминал в кръвообращението ЛПЗ изследвахме серумни нива на sCD14 чрез *ELISA Kit Human sCD14, R&D Systems, No. 321628, с линеен обхват 0-16000 pg/ml*. Изследването проведохме еднократно изходно при всички включени в изследването лица.

При 10 от пациентите с HCV цироза оценихме маркера двукратно – изходно и 6 месеца след проведена безинтерферонова терапия с постигнат траен вирусологичен отговор. Успоредно с това изследвахме чернодробни ензими, албумин, билирубин, INR и тромбоцитен брой.

### **3.3 Статистическа обработка на резултатите**

Използвахме следните статистически методи за оценка на достоверността на аполучените резултати: дескриптивна статистика; тест на Колмогоров-Смирноф за проверка на вида на разпределение на данните в групите

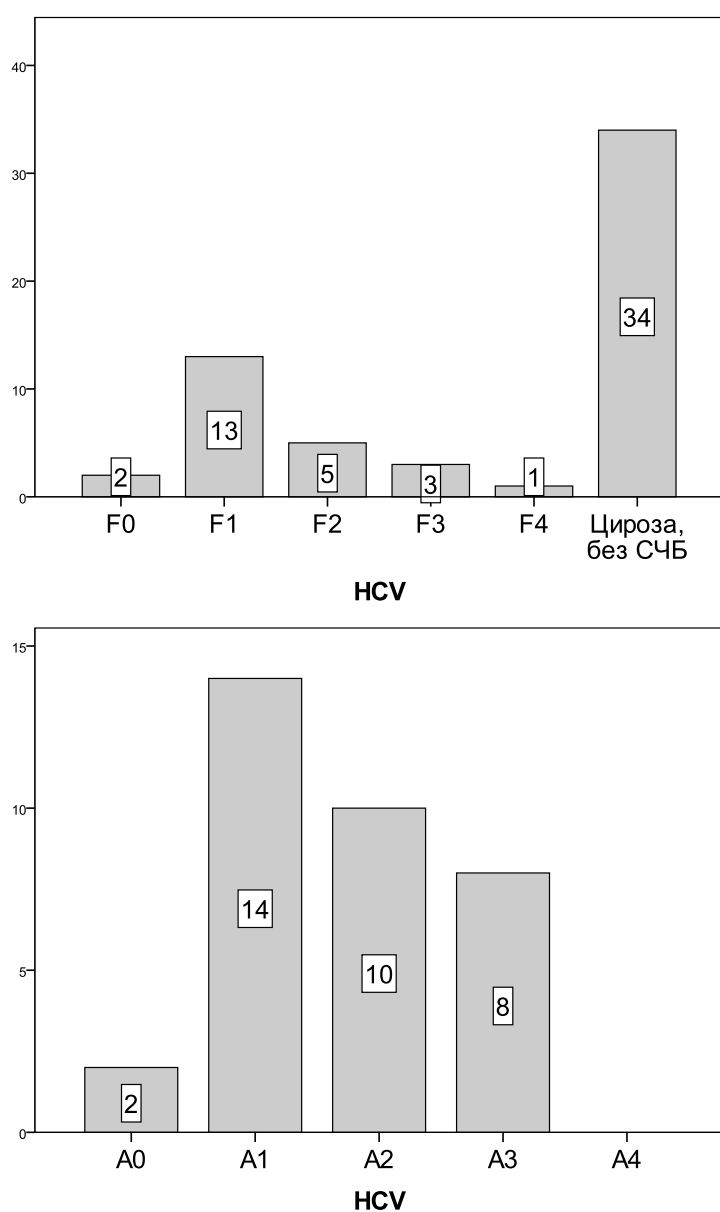
(Гаусово/не-Гаусово); тест на Shapiro-Wilk за проверка на вида на разпределение на данните при групи с по-малко от 50 лица; Student (t-тест) за сравняване на две независими групи данни при Гаусово разпределение; непараметричен тест на Mann-Whitney за сравнение на две независими групи и откриване на статистически значима разлика при не-Гаусово разпределение; ANOVA; корелационен анализ – Spearman при не-Гаусово разпределение и Pearson при Гаусово разпределение и оценка на силата на корелационните коефициенти.

Получените резултати са оценени като статистически достоверни при прагово ниво на значимост  $p < 0.05$ .

## 4 РЕЗУЛТАТИ

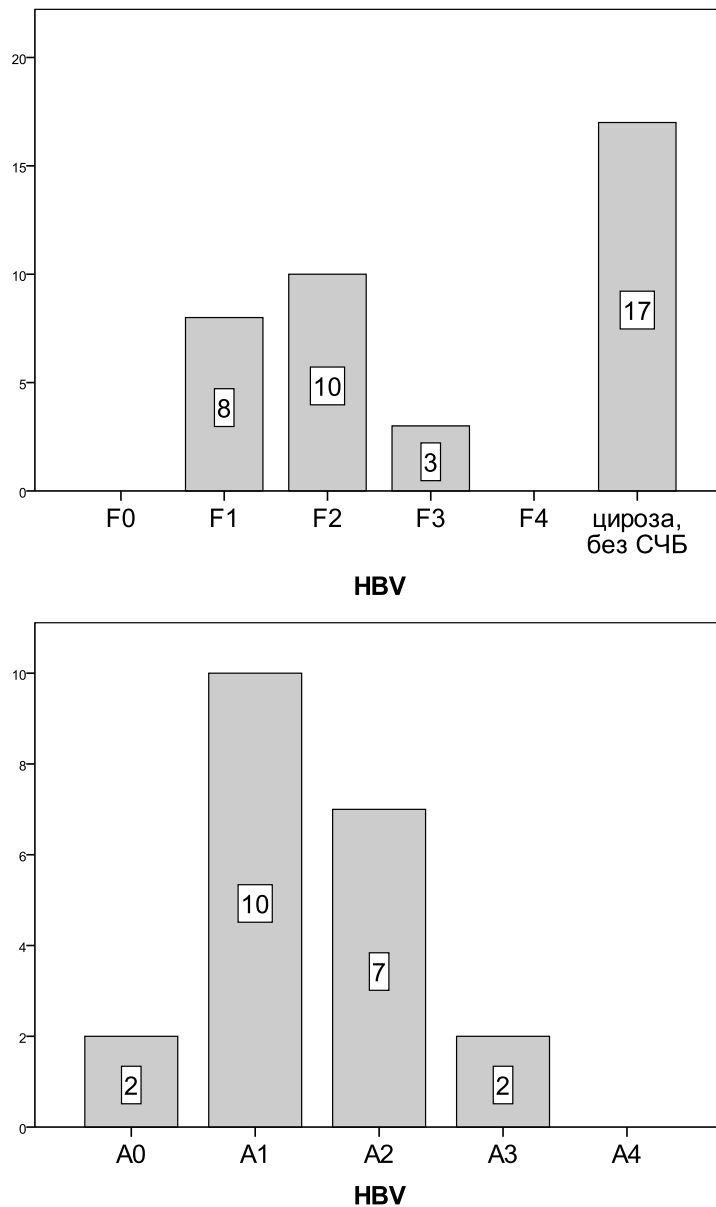
Разпределение на данните:

В групата с С вирусна инфекция имаше данни за начална фиброза (F0-2) при 22 болни и за напреднала фиброза (F3-4) при 39 болни (липсват данни за 4 болни). Лека хистологична активност (до A2) установихме при 26 от болните, а изразена – при 8. (Фиг. 4)



Фиг. 4 Разпределение на пациентите с HCV по стадий на фиброзата (F) и тежест на хистологичната активност (A)

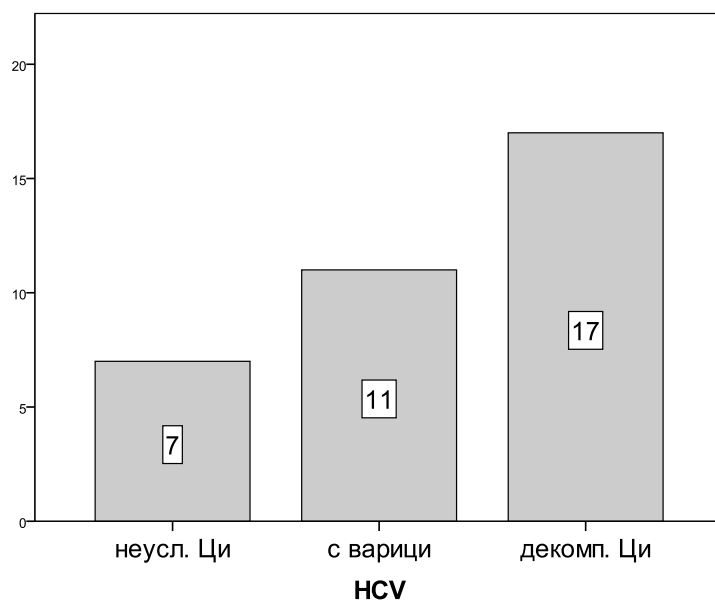
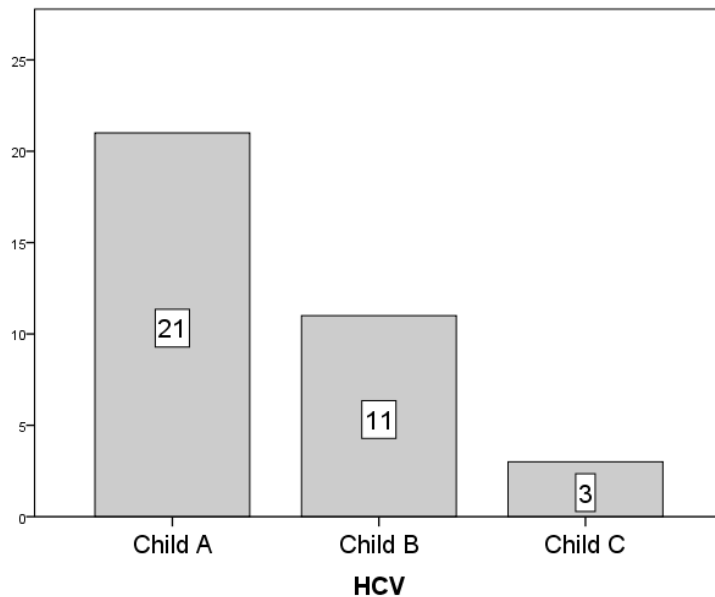
В групата с хепатит В инфекция 18 болни имаха данни за начална фиброза, а 20 – за напреднала фиброза (липсват данни за 6 болни). 19 от болните имаха данни за лекостепенна хистологична активност, а 2 – изразена хистологична активност. (фиг. 5)

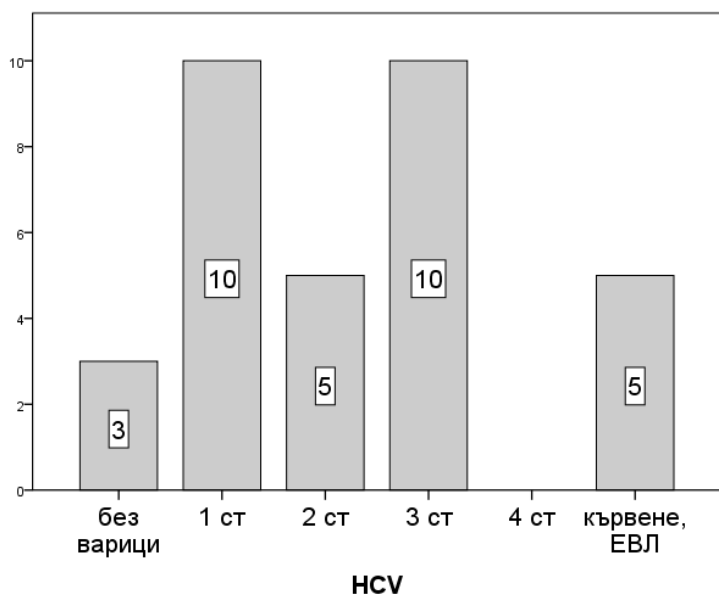


Фиг. 5 Разпределение на пациентите с HBV по стадий на фиброзата (F) и тежест на хистологичната активност (A)

В групата с С вирусна инфекция 35 от пациентите бяха с данни за чернодробна цирроза – 21 Чайлд А, 11 Чайлд В и 3 Чайлд С. 7 от пациентите бяха с неусложнена болест, 11 имаха варици на хранопровода, 17 – бяха с настоящ

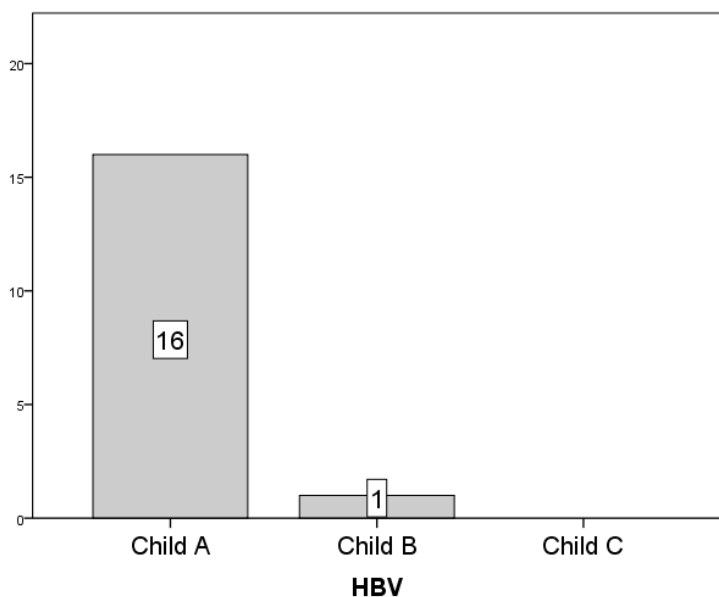
или предшестващ епизод на декомпенсация. При 18 пациенти имаше данни за нискорискови или липсващи варици на хранопровода, а при 15 – високорискови варици или предшестващ епизод на кръвоизлив от варици на хранопровода (липсват данни за 2 пациента с противопоказания за ендоскопско изследване). (фиг. 6)

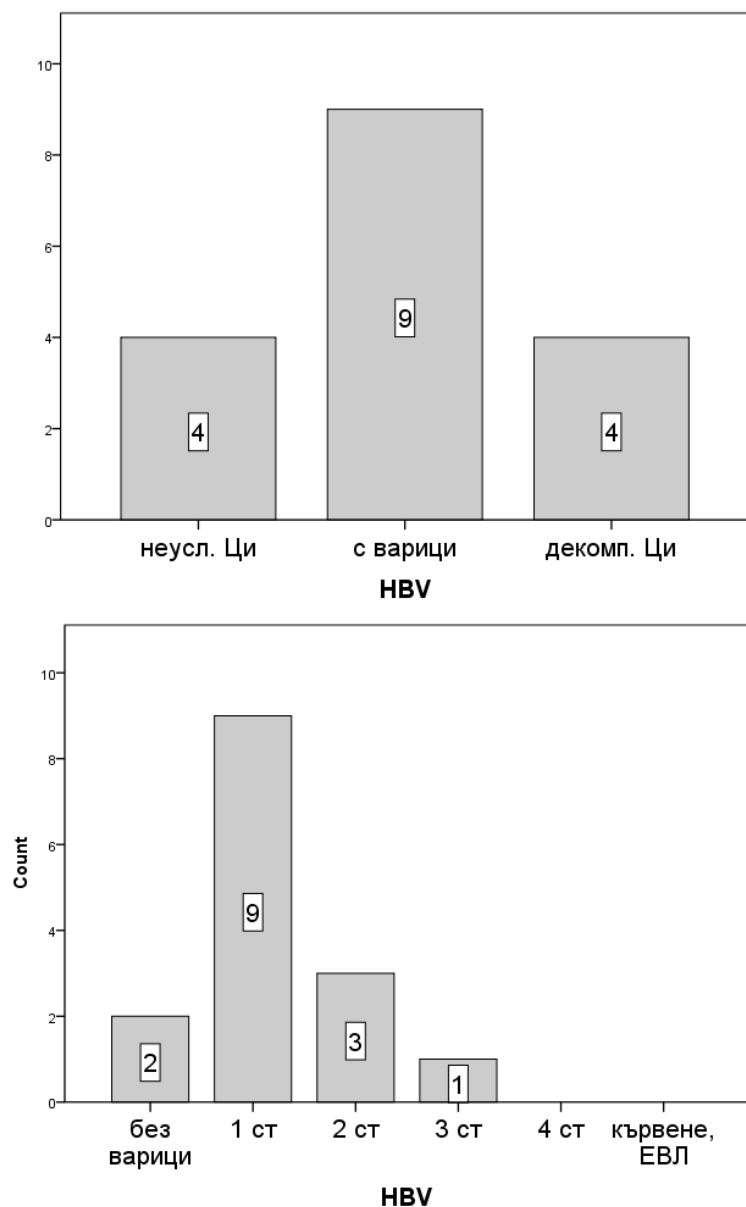




Фиг. 6 Разпределение на пациентите с HCV-цироза по Чайлд, според наличието на усложнения на болестта, според тежестта на вариците на хранопровода

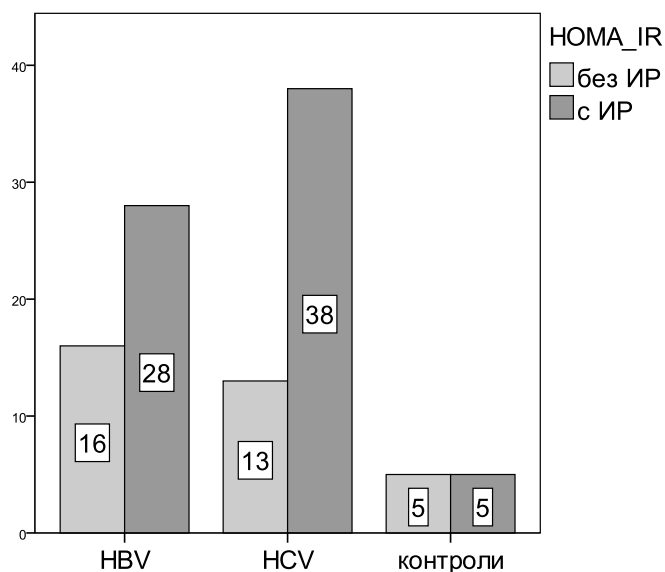
16 от пациентите с В вирусна цирроза бяха Чайлд А, а 1 – Чайлд В в момента на включване в изследването. 4 от пациентите бяха с неусложнена болест, 9 имаха варици на хранопровода, 4 бяха с настоящ или предшестващ епизод на декомпенсация. Данни за нискорискови варици на хранопровода имаше при 14 болни, а 1 пациент беше с високорискови (липсват ендоскопски данни за 2 пациента). (фиг. 7)





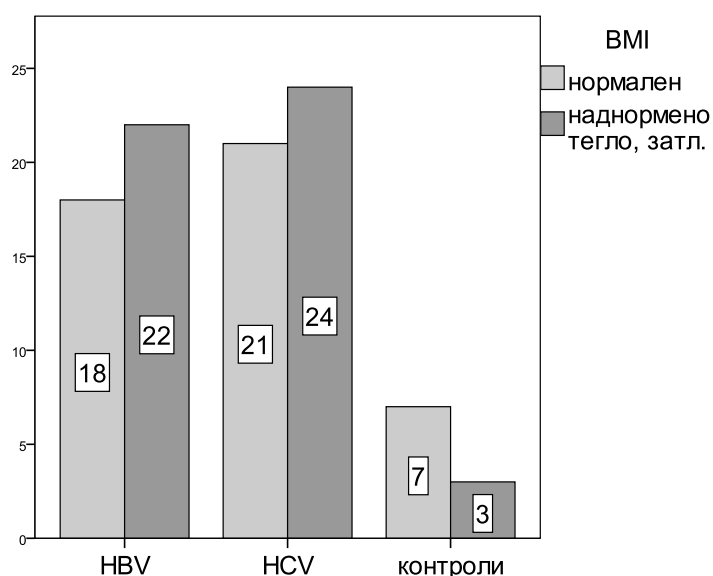
Фиг. 7 Разпределение на пациентите с HBV-цироза по Чайлд, според наличието на усложнения на болестта, според тежестта на вариците на хранопровода

По отношение на инсулиновата резистентност от пациентите с С вирусна инфекция без ИР бяха 13, с ИР – 38 болни (липсват данни при 14 болни), 16 от пациентите с В вирусна инфекция бяха без ИР, а 28 – с ИР, а в групата на здравите контроли по 5 души бяха съответно без и с ИР. (фиг. 8)



Фиг. 8 Разпределение на пациентите според НОМА-индекса

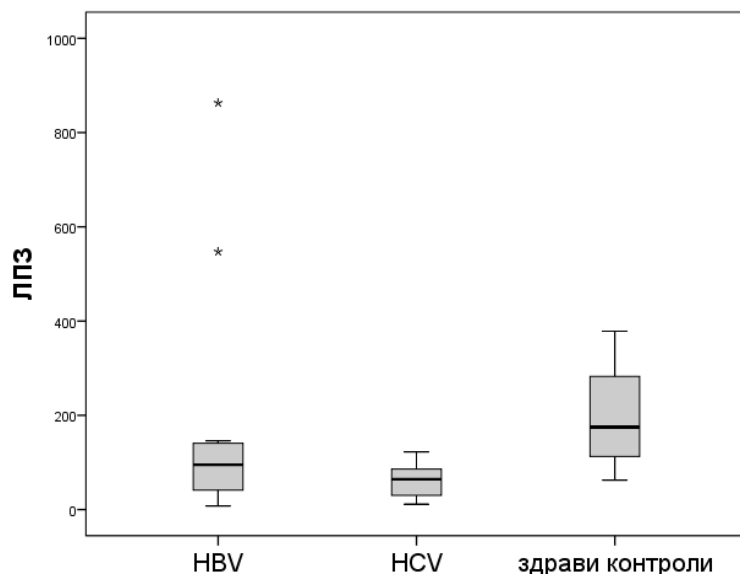
От пациентите с С вирусна инфекция 21 бяха с нормален индекс на телесната маса, а 24 – с наднормено тегло или затлъстяване (при 20 болни липсват демографски данни или има наличие на асцит). От пациентите с В вирусна инфекция съответно 18 и 22 са с нормално или наднормено тегло/затлъстяване (липсват данни за 4 болни). От здравите контроли 7 души са с нормален индекс на телесната маса, а 3 с наднормено тегло. (фиг. 9)



Фиг. 9 Разпределение на пациентите според ИТМ

#### 4.1 Изследване на серумни нива на ЛПЗ при пациенти с хронична С и В вирусна инфекция и здрави контроли

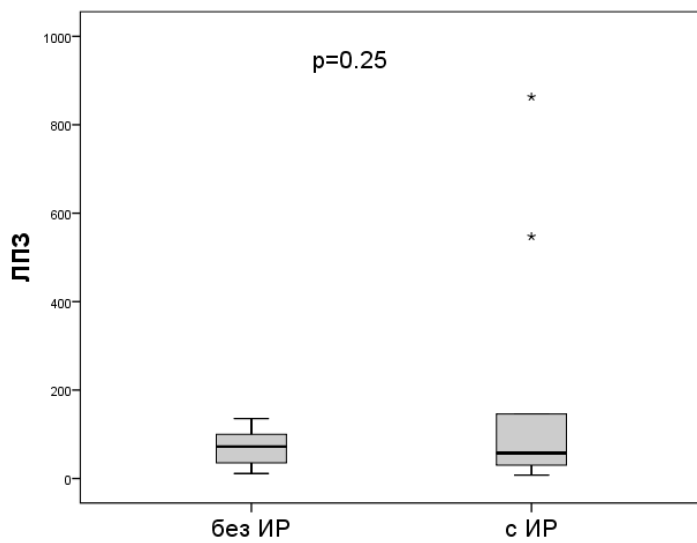
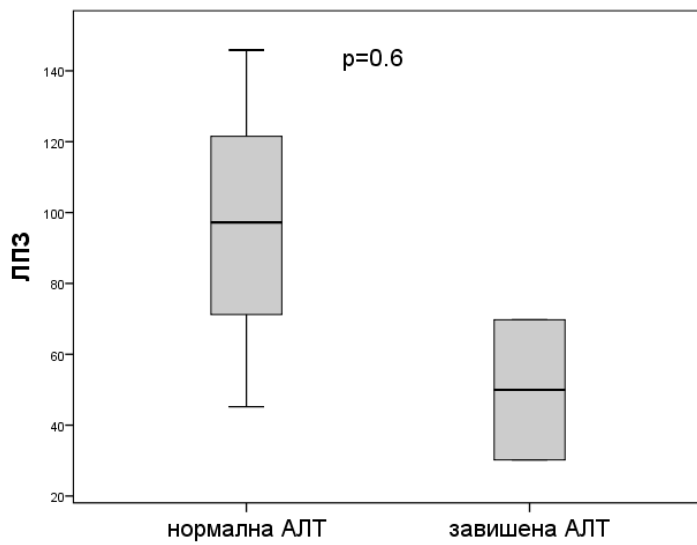
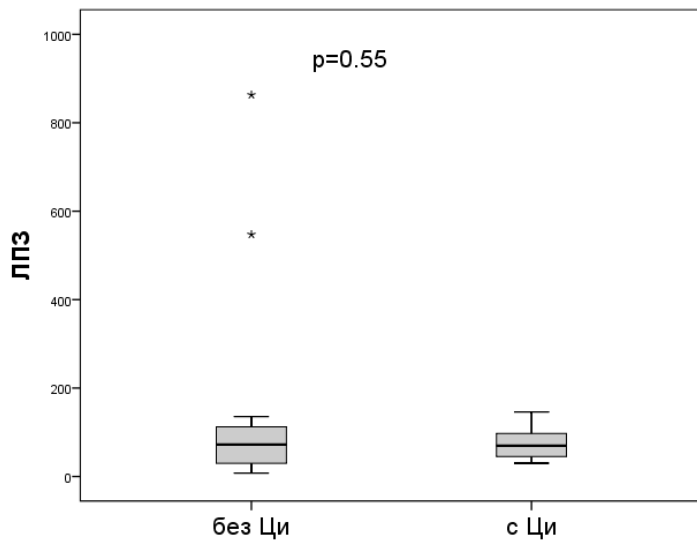
Не установихме значима разлика в нивата на ЛПЗ между групите, като имаше тенденция към по-високи стойности при здравите контроли в сравнение с пациентите с С и В вирусна инфекция. (фиг. 9)



Фиг. 9 Сравнение в нивата на ЛПЗ между групите

Не установихме значима разлика в серумните нива на ЛПЗ по отношение на стадия на фиброзата ( $p=0.6$ ), наличието или не на цирроза ( $p=0.55$ ), наличието на нормална или повишена АЛТ ( $p=0.6$ ), наличието или не на инсулинова резистентност ( $p=0.25$ , с тенденция към по-високи нива при пациентите с ИР). (фиг. 10)

Нивата на ЛПЗ не корелираха със стадия на фиброзата, степента на хистологичната активност, цитолитичните ензими, инсулиновата резистентност, маркерите за тежест на чернодробното заболяване. Наблюдавахме единствено слаба корелация с индекса на телесната маса ( $r=0.56$ ,  $p=0.004$ ).



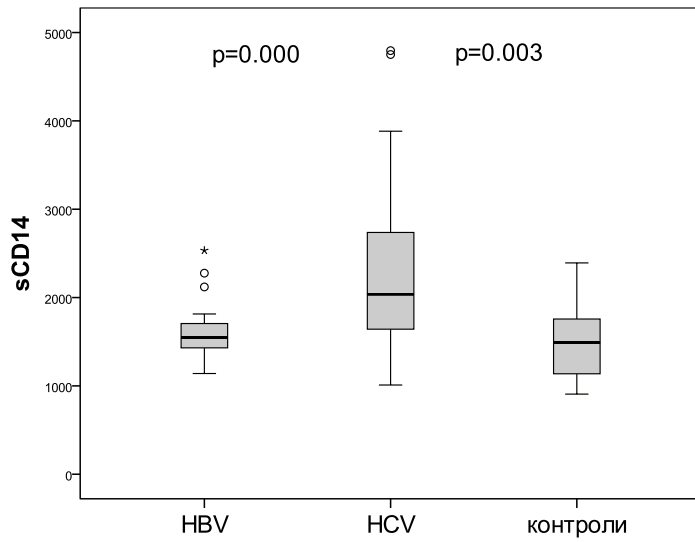
Фиг. 10 Разлика в стойностите на ЛПЗ според наличието или не на цирроза, повишена АЛТ, инсулинова резистентност.

## **4.2 Оценка на връзката на sCD14 с фиброзата и тежестта на чернодробното заболяване**

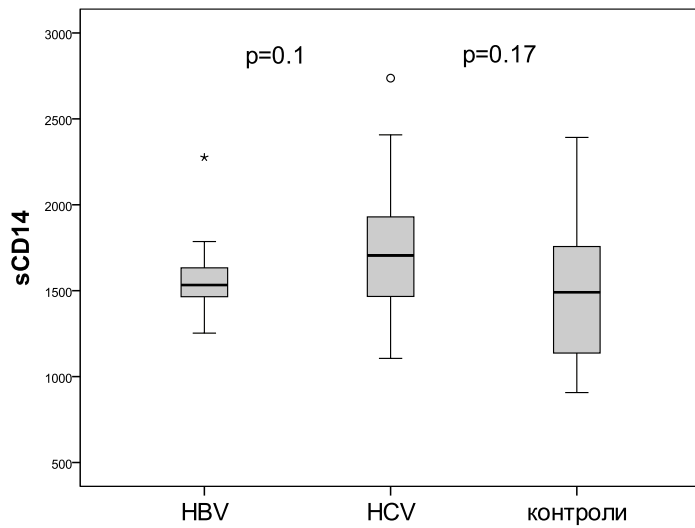
### **4.2.1 Разлики между групите**

Наблюдавахме значимо по-високи серумни нива на sCD14 при пациентите с С вирусна инфекция в сравнение със здравите контроли ( $p=0.003$ ) и спрямо пациентите с В вирусна инфекция ( $p=0.000$ ). (фиг. 11А) Тази разлика беше за сметка на пациентите с HCV чернодробна цироза и загуби значимост при изключването им от анализа (съответно  $p=0.17$  спрямо контролите и  $p=0.1$  спрямо пациентите с В вирусна инфекция). (фиг. 11Б) Не установихме значима разлика между пациентите с хепатит В инфекция и здравите контроли ( $p=0.48$ ).

Пациентите с С-вирусна цироза имаха значимо по-високи нива на sCD14 в сравнение със здравите контроли ( $p=0.000$ ) и в сравнение с пациентите с В-вирусна цироза ( $p=0.000$ ). (фиг. 11В) Не установихме значима разлика в нивата на маркера между циротиците с В-вирусна етиология и здравите контроли ( $p=0.32$ ).

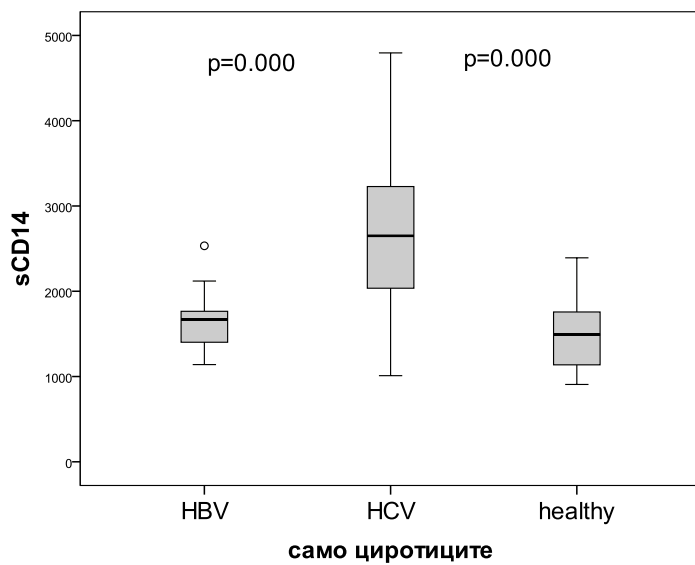


А.



без циротиците

Б.



само циротиците

В.

Фиг. 11 Разлика в нивата на sCD14 между групите при: А. всички индивиди, Б. без циротиците, В. пациентите с цироза

На таблица 2 са сравнени медианите на някои показатели за възпалителна активност и тежест на чернодробното заболяване между пациентите с хронична С и В инфекция. Наблюдавахме значимо по-тежко чернодробно заболяване при пациентите с С вирусна инфекция, оценена чрез APRI-скора и показателите за тежест на чернодробното заболяване – албумин, билирубин, INR, тромбоцитен брой. В групата с С етиология на болестта имаше по-голям брой пациенти с декомпенсирана цирроза. Наблюдавахме и значимо по-високи стойности на чернодробните ензими при пациенти с HCV – вероятно във връзка с факта, че почти всички болни бяха наивни в началото на изследването, докато в групата с В вирусна инфекция повечето пациенти бяха на терапия с постигнат контрол над виремията и цитолизата. Здравите контроли имаха значимо по-ниски стойности на чернодробните ензими в сравнение с пациентите с С и В вирусна инфекция ( $p=0.000$ ), като не се различаваха по отношение на НОМА-индекса, индекса на телесната маса и стойностите на високочувствителния С-реактивен протеин от пациентите.

Табл. 2 Сравнение на някои маркери между групите

|            | HCV                   | HBV                       | p      | Контроли                |
|------------|-----------------------|---------------------------|--------|-------------------------|
|            | Медиана (iqr)         | Медиана (iqr)             |        | Медиана (iqr)           |
| sCD14      | 2037.5<br>(1010-4795) | 1548.5<br>(1548.5-1707.5) | 0.000  | 1491.5<br>(1117.5-1779) |
| НОМА-IR    | 2.61<br>(0.44-16.93)  | 2.69<br>(1.69-3.81)       | > 0.05 | 2.0<br>(1.3-3.3)        |
| hsCRP      | 1.9<br>(0.1-30.0)     | 1.9<br>(0.8-4.5)          | > 0.05 | 3<br>(1.3-8.2)          |
| ИТМ        | 25.9<br>(18.2-41.3)   | 25.5<br>(23.6-27.9)       | > 0.05 | 24.2<br>(19.7-28.3)     |
| APRI       | 1.32<br>(0.06-24.3)   | 0.37<br>(0.24-0.51)       | 0.000  |                         |
| Общ бил.   | 16<br>(4-93)          | 11<br>(8-15)              | 0.001  |                         |
| Албумин    | 44.0<br>(26-53)       | 47<br>(44-49)             | 0.001  |                         |
| Тромбоцити | 146<br>(25-334)       | 202<br>(161-234)          | 0.003  |                         |
| АСТ        | 60.0<br>(5-264)       | 25<br>(19-36)             | 0.000  | 16<br>(15-18)           |
| АЛТ        | 57.5<br>(13-206)      | 26<br>(19-47)             | 0.000  | 11<br>(10-17)           |
| ГГТ        | 46.5<br>(11-585)      | 26<br>(15-43)             | 0.000  | 3<br>(1-8)              |

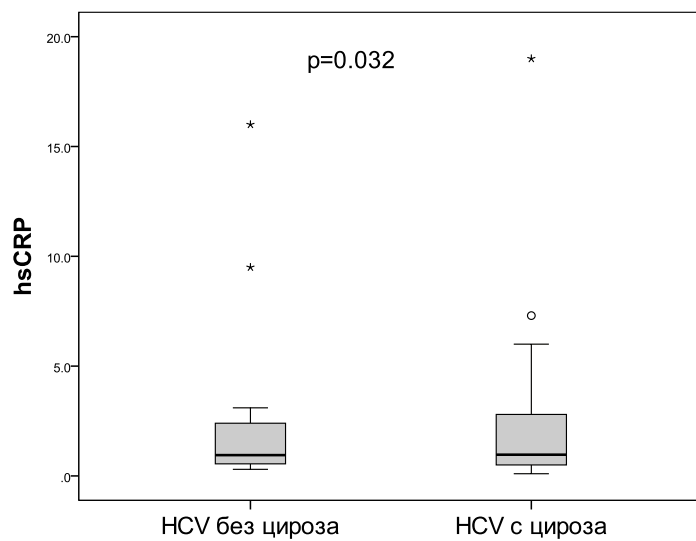
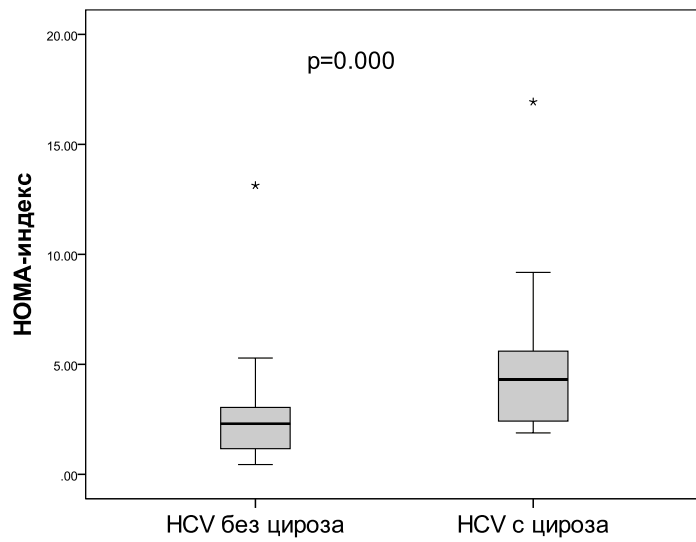
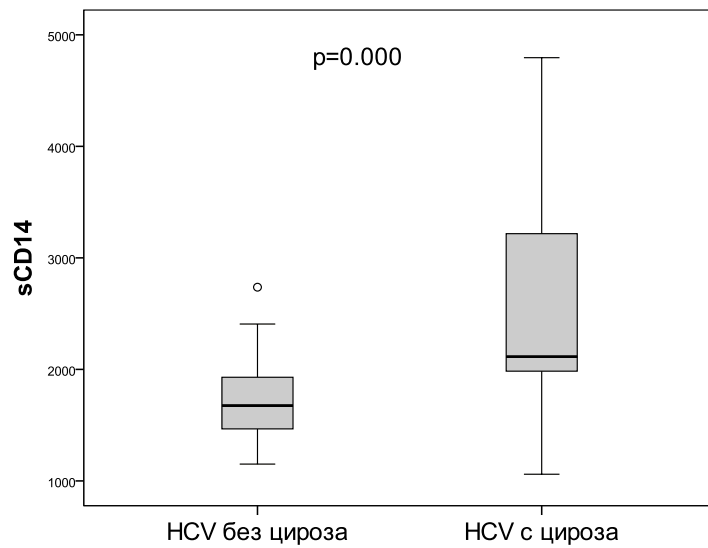
#### 4.2.2 sCD14 и стадий на фиброзата при хронична С вирусна инфекция

Наблюдавахме значимо по-високи серумни нива на sCD14 при пациентите с цироза в сравнение с тези без цироза ( $p=0.000$ ), като двете групи се различаваха значимо по степента на инсулиновата резистентност ( $p=0.000$ ), нивата на цитолитичните ензими ( $p=0.007$  за АЛТ), маркерите за тежест на

чернодробното увреждане ( $p=0.000$  за билирубин, албумин, INR и тромбоцити), hsCRP ( $p=0.032$ ), ИТМ ( $p=0.014$ ). (табл. 3, фиг. 12)

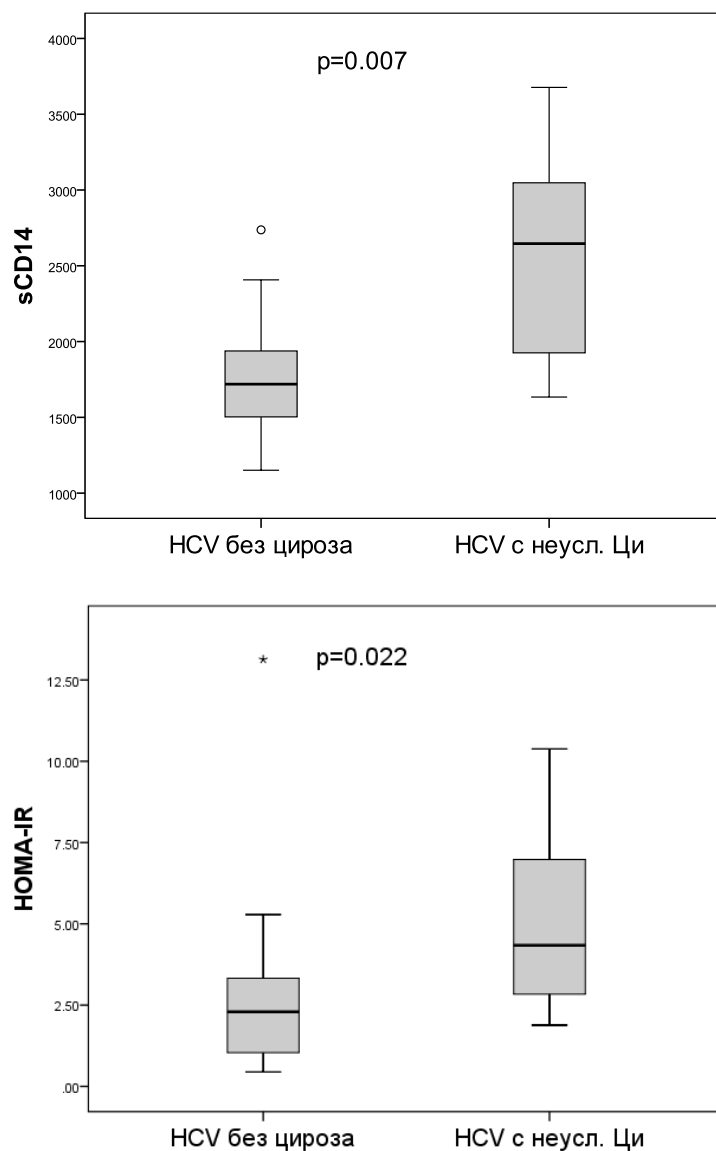
Табл. 3 Сравнение на някои показатели между HCV пациентите без и с цироза

|            | <b>НСV без цироза</b> | <b>НСV с цироза</b>  | <b>p</b> |
|------------|-----------------------|----------------------|----------|
|            | <b>Медиана (iqr)</b>  | <b>Медиана (iqr)</b> |          |
| sCD14      | 1706<br>(1430-1938)   | 2649<br>(2027-3239)  | 0.000    |
| НОМА-IR    | 2.3<br>(1-3.4)        | 4.6<br>(2.4-7.5)     | 0.000    |
| ИТМ        | 24<br>(21.5-27.6)     | 27.1<br>(25-31.4)    | 0.014    |
| hsCRP      | 1<br>(0.5-2.2)        | 2.1<br>(0.8-6.1)     | 0.032    |
| АСТ        | 29<br>(23-45)         | 86<br>(62-128)       | 0.000    |
| АЛТ        | 39<br>(25-76)         | 71<br>(46-111)       | 0.007    |
| ГГТ        | 30<br>(18-79)         | 59<br>(36-101)       | 0.012    |
| Общ бил.   | 9<br>(7-12)           | 27<br>(16-48)        | 0.000    |
| Албумин    | 47<br>(46-49)         | 36<br>(29-42)        | 0.000    |
| INR        | 1.0<br>(0.9-1.1)      | 1.3<br>(1.1-1.5)     | 0.000    |
| Тромбоцити | 219<br>(182-264)      | 78<br>(47-130)       | 0.000    |



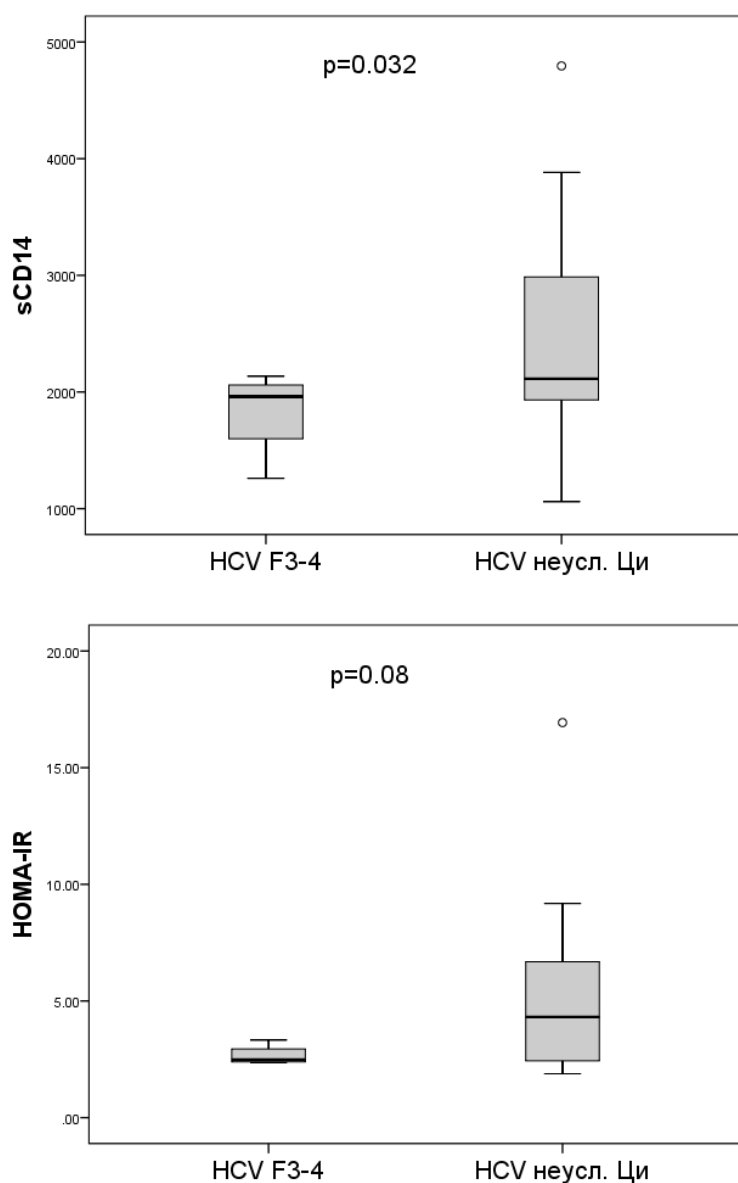
Фиг. 12 Разлика в нивата на sCD14, НОМА-индекса и hsCRP между HCV пациентите без и с чернодробна цирроза

Разликата в стойностите на някои от показателите остана сигнификантна и между пациентите с неусложнена цирроза (без данни за изразена портална хипертония, оценена като липса на варици на хранопровода; без епизод на предшестваща или настояща декомпенсация) и тези без чернодробна цирроза. При циротиците наблюдавахме значимо по-високи нива на sCD14 ( $p=0.007$ ), НОМА-индекса ( $p=0.022$ ), (фиг. 13) чернодробните ензими ( $p=0.04$  за АЛТ,  $p=0.013$  за АСТ), маркерите за тежест на чернодробното заболяване ( $p=0.003$  за албумина,  $0.034$  за INR,  $0.009$  за тромбоцитите), хистологичната активност ( $p=0.034$ ).



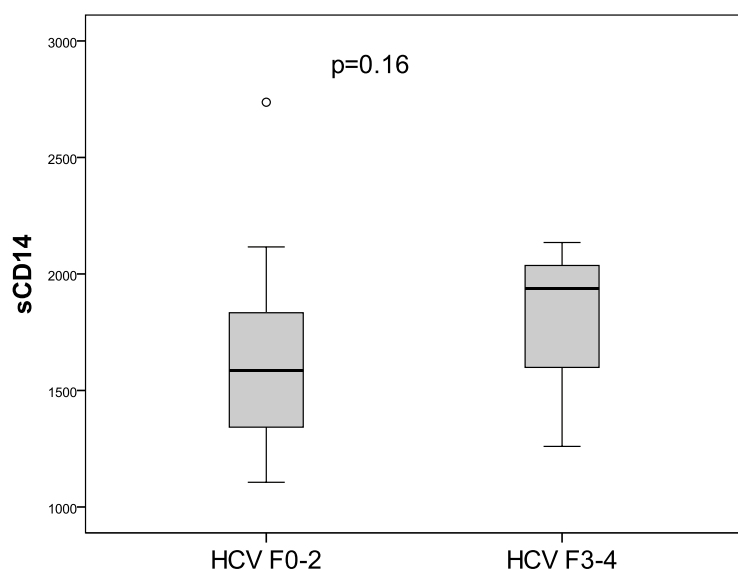
Фиг. 13 Разлика в стойностите на sCD14 и НОМА-индекса при HCV пациенти без цирроза спрямо неусложнена цирроза

Пациентите с напреднала фиброза (F3-4) имаха по-ниски нива на sCD14 спрямо пациентите с неусложнена цироза (без епизод на декомпенсация, без варици на хранопровода) ( $p=0.032$ ), като двете групи не се различаваха по стойностите на НОМА-индекса и hsCRP. (фиг. 14) Циротиците имаха значимо по-високи билирубин ( $p=0.03$ ), INR ( $p=0.001$ ) и АСТ ( $p=0.007$ ) и по-ниски албумин ( $p=0.005$ ) и тромбоцити ( $p=0.013$ ).



Фиг. 14 Разлика в стойностите на sCD14 и НОМА-индекса при HCV пациенти с напреднала фиброза спрямо неусложнена цироза

След изключване на пациентите с чернодробна цироза не установихме значима разлика в серумните нива на sCD14 между пациентите с начална (F0-2) и напреднала фиброза (F3-4) ( $p=0.16$ , фиг. 15). Двете групи не се различаваха значимо по нивата на цитолитичните ензими, възпалителните маркери, инсулиновата резистентност, показателите за тежест на чернодробното увреждане (албумин, билирубин, INR, тромбоцитен брой).



Фиг. 15 Нива на sCD14 при HCV пациенти с начална и напреднала фиброза

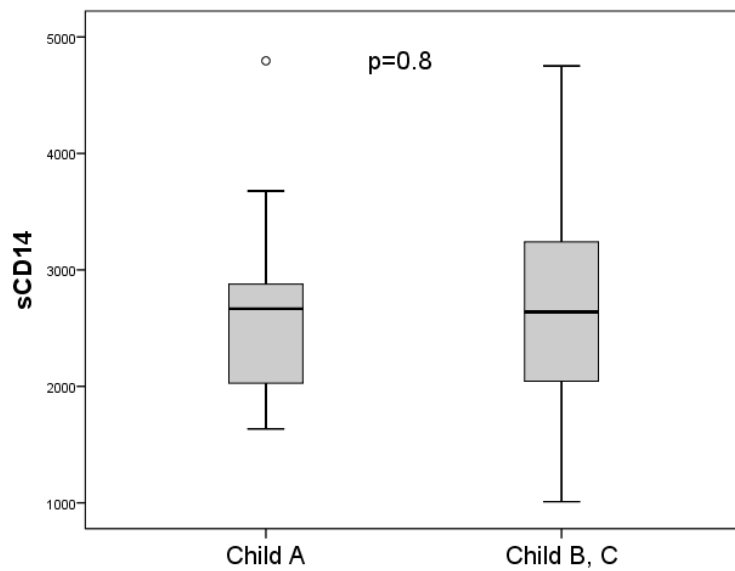
В групата болни без чернодробна цироза не установихме значими корелации на нивата на sCD14 с цитолитичните ензими, стадия на фиброзата, показателите за тежест на заболяването, инсулиновата резистентност.

#### 4.2.3 sCD14 и тежест на цирозата при хронична С вирусна инфекция

При пациентите с чернодробна цироза сравнихме маркерите за системна и чернодробна възпалителна активност и показателите за тежест на чернодробното заболяване по отношение на Child-скора, тежестта на порталната хипертония, оценена чрез степента на вариците на хранопровода и наличието или не на минал или настоящ епизод на декомпенсация на заболяването.

Не установихме значима разлика в серумните нива на sCD14 при пациентите с Чайлд А спрямо пациентите с Чайлд В и С ( $p=0.8$ , фиг. 16), като

декомпенсираните циротици имаха значително по-високи стойности на билирубина, INR и hsCRP ( $p=0.000$ ) и по-ниски на албумина ( $p=0.000$ ) и тромбоцитите ( $p=0.011$ ).

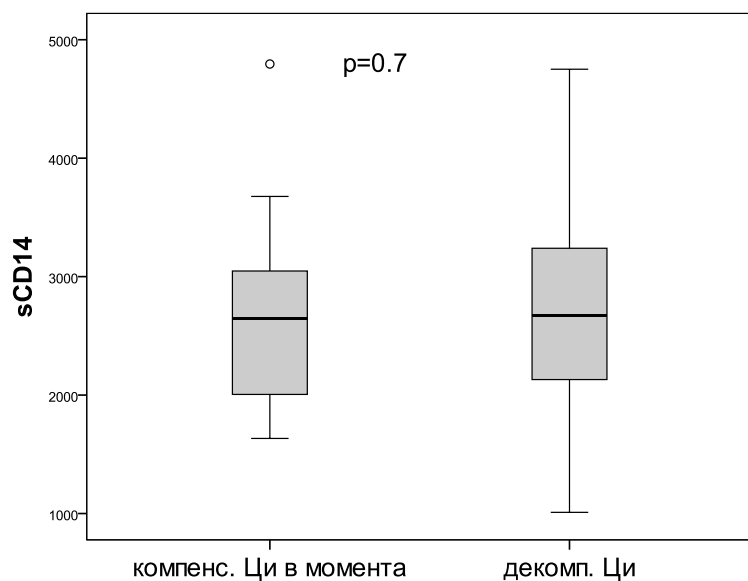


Фиг. 16 Нива на sCD14 според Чайлд-скора при HCV инфекция

Табл. 4 Сравнение на някои показатели при HCV цирроза според Чайлд-скора

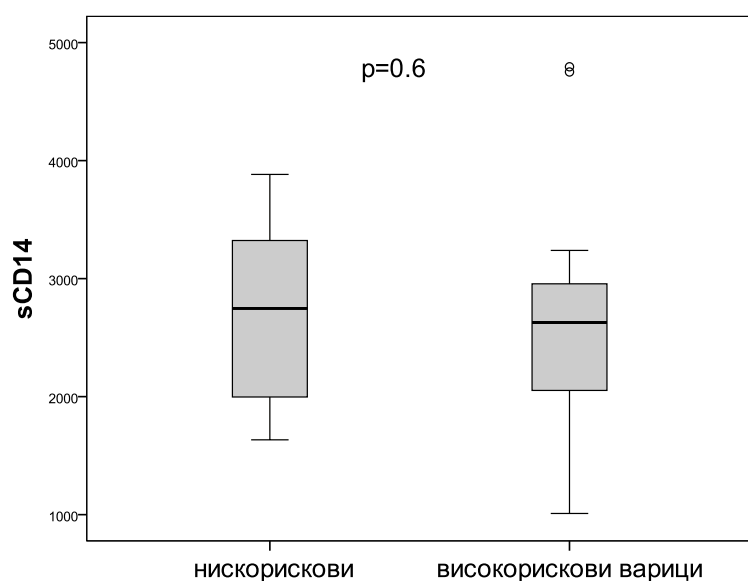
|            | Child A             | Child B, C          | p     |
|------------|---------------------|---------------------|-------|
|            | Медиана (iqr)       | Медиана (iqr)       |       |
| sCD14      | 2666<br>(2006-3048) | 2639<br>(2032-3263) | >0.05 |
| НОМА-IR    | 4.3<br>(2.4-8.7)    | 5.1<br>(2.4-7.3)    | >0.05 |
| hsCRP      | 0.9<br>(0.4-2.1)    | 6.7<br>(3.1-10)     | 0.000 |
| ИТМ        | 27.1<br>(24.2-30.8) | 22.8<br>(25.3-34.1) | >0.05 |
| Общ бил.   | 20<br>(15-28)       | 47<br>(35-51)       | 0.000 |
| Албумин    | 40<br>(37-44)       | 29<br>(28-33)       | 0.000 |
| Тромбоцити | 96<br>(62-154)      | 47<br>(37-94)       | 0.011 |
| АСТ        | 79<br>(53-127)      | 102<br>(72-151)     | >0.05 |
| АЛТ        | 78<br>(51-120)      | 54<br>(39-105)      | >0.05 |
| ГГТ        | 60<br>(42-142)      | 52<br>(23-106)      | >0.05 |

Не наблюдавахме значима разлика в нивата на sCD14 между пациентите с компенсирана цирроза в момента на включване в изследването (Чайлд А, без данни за хепатоцелуларен карцином, независимо от минал епизод на декомпенсация) и пациентите с данни за настоящ епизод на декомпенсация (Чайлд В или С, данни за хепатоцелуларен карцином,  $p=0.7$ , фиг. 17). Пациентите от втората група имаха значимо по-високи стойности на общия и директния билирубин, INR и hsCRP ( $p=0.000$ ) и по-ниски на албумина ( $p=0.000$ ) и тромбоцитите ( $p=0.026$ ).



Фиг. 17 Разлика в нивата на sCD14 между HCV цирроза, компенсирана/декомпенсирана понастоящем

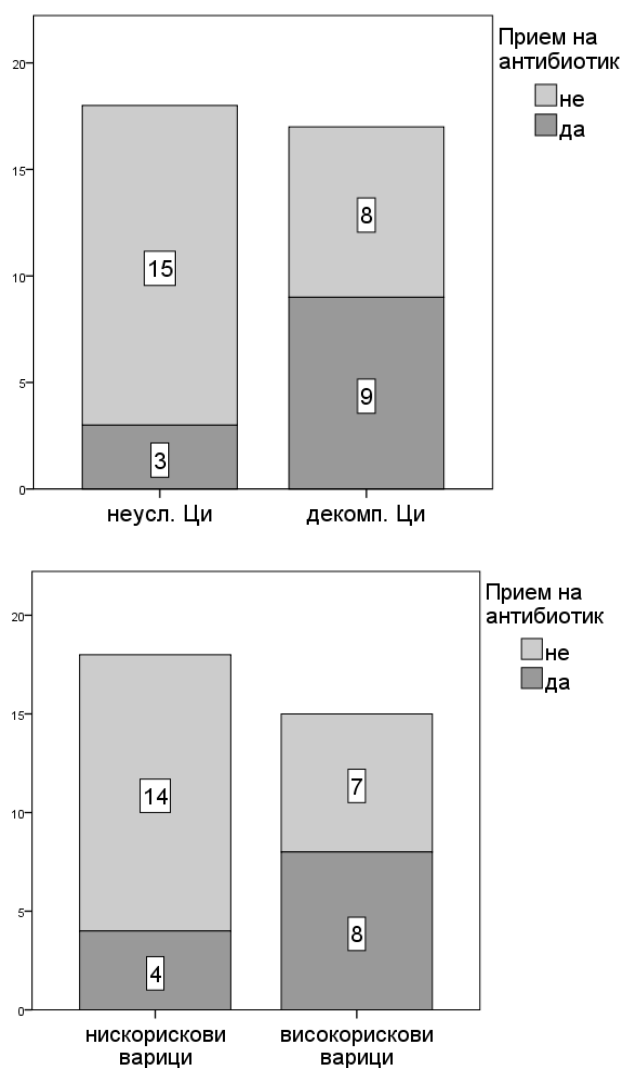
Не установихме значима разлика в нивата на sCD14 между пациентите с високо- и нискорискови варици на хранопровода – индиректен белег за тежест на порталната хипертония ( $p=0.6$ , фиг. 18). Двете групи не се различаваха по маркерите за тежест на чернодробното заболяване, цитолитичните ензими, възпалителните маркери и Child-скора.



Фиг. 18 Разлика в нивата на sCD14 при HCV цирроза с високо- или нискорискови варици на хранопровода

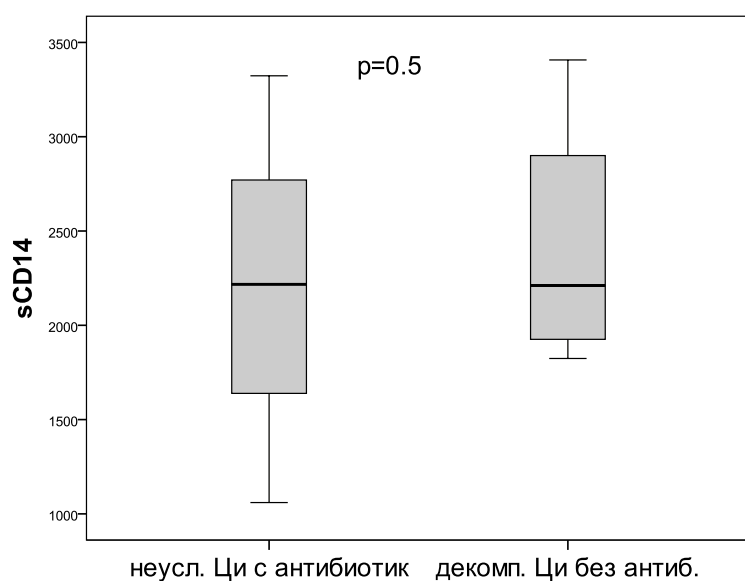
Сравнихме групите по прием на антибиотик до 3 месеца преди включване в изследването и на Пропранолол с оглед на съобщения за благоприятното им въздействие върху бактериалния свръхрастеж и бактериалната транслокация. Оценихме възможно ли е приемът на тези медикаменти да е причината за несигнификантната разлика в нивата на sCD14 и възпалителните маркери между пациенти с различна тежест на порталната хипертония и с компенсирани/декомпенсирани болести.

Установихме по-висока честота на скорошен прием на антибиотик в групите с декомпенсирани цироза и високорискови варици на хранопровода. (фиг. 19)



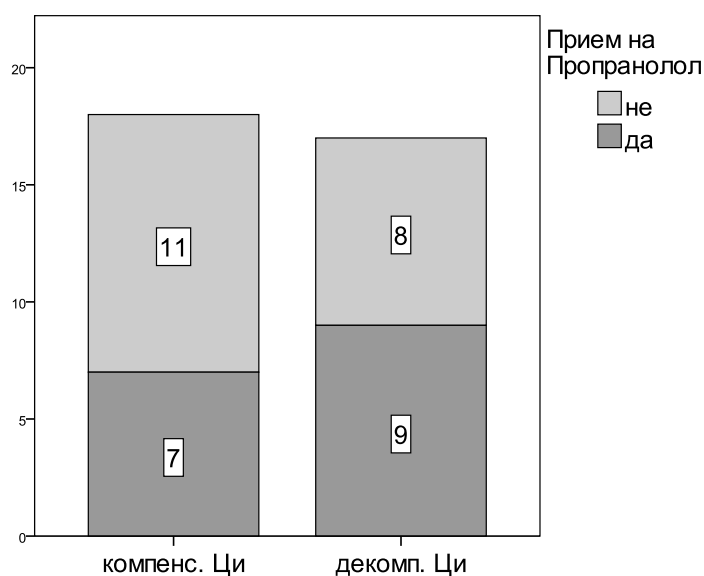
Фиг. 19 Антибиотичен прием при пациентите с HCV цироза

Нивата на sCD14 не се различаваха между пациентите с и без скорошен прием на антибиотик ( $p=0.9$ ), също и в отделните подгрупи. Не установихме разлика в нивата на маркера дори между пациентите с неусложнена болест, приемали антибиотик в близките 3 месеца и декомпенсираните циротици без скорошен прием на антибиотик ( $p=0.5$ , фиг. 20).



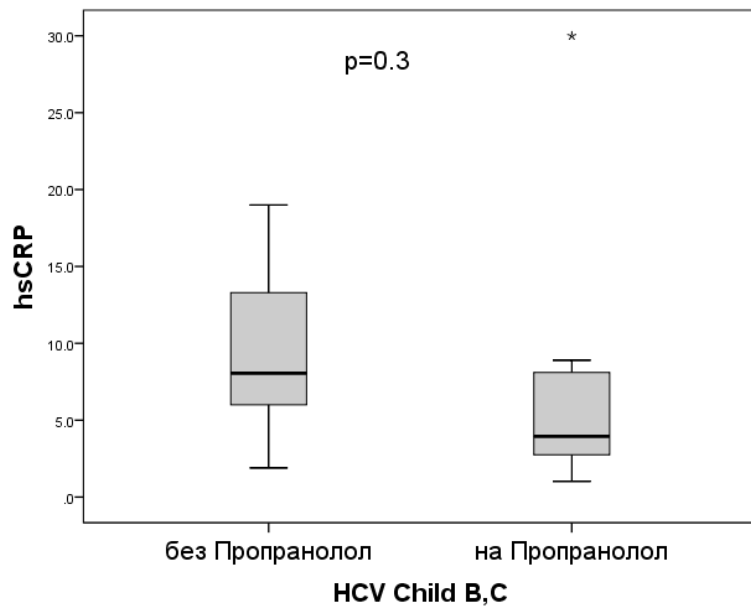
Фиг. 20 Нива на sCD14 при HCV пациенти с неусложнена и декомпенсирана цироза според антибиотичния прием

На фиг. 21 е представен относителният дял пациенти приемащи Пропранолол в групата с компенсирани и декомпенсирани цироза.



Фиг. 21 Прием на Пропранолол в групите с компенсирани и декомпенсирани цироза

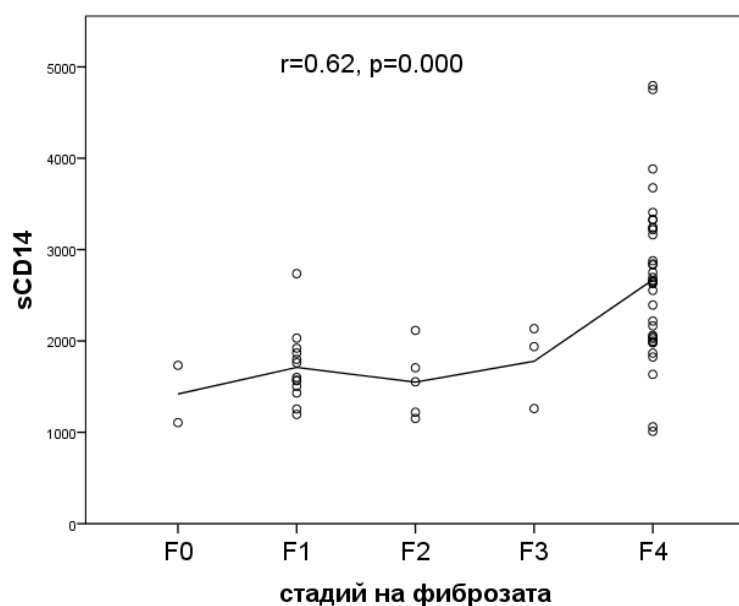
Не установихме значима разлика в стойностите на sCD14 между пациентите приемащи и не приемащи Пропранолол ( $p=0.4$ ). Наблюдавахме тенденция към по-ниски стойности на hsCRP при пациентите, приемащи Пропранолол в групата с декомпенсация на заболяването (Чайлд В, С) ( $p=0.3$ , фиг. 22). Пациентите, приемащи Пропранолол, имаха значимо по-висока степен варици на хранопровода ( $p=0.012$ ), като не се различаваха значимо по възпалителни маркери и показатели за тежест на чернодробното увреждане от пациентите, които не приемаха Пропранолол.



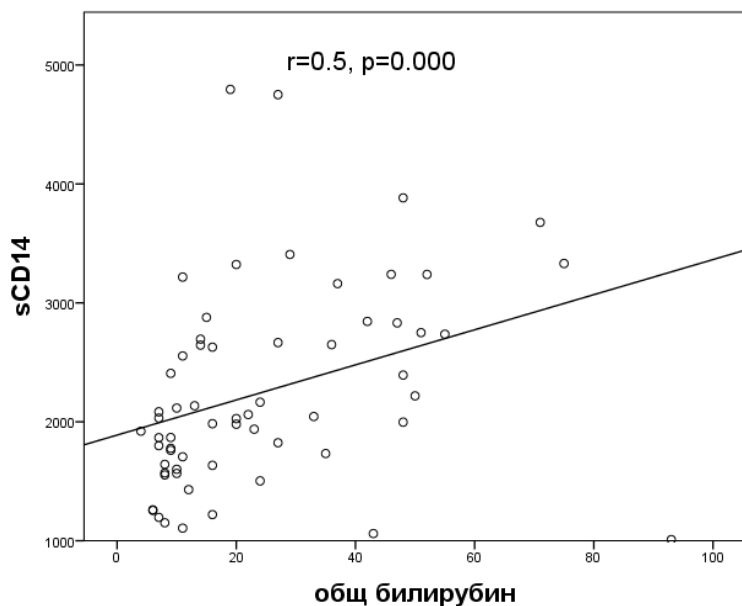
Фиг. 22 серумни нива на hsCRP според приема на Propranolол при декомпенсирана цирроза

#### 4.2.4 Корелации на sCD14 с маркерите за тежест на чернодробното заболяване при хронична С вирусна инфекция

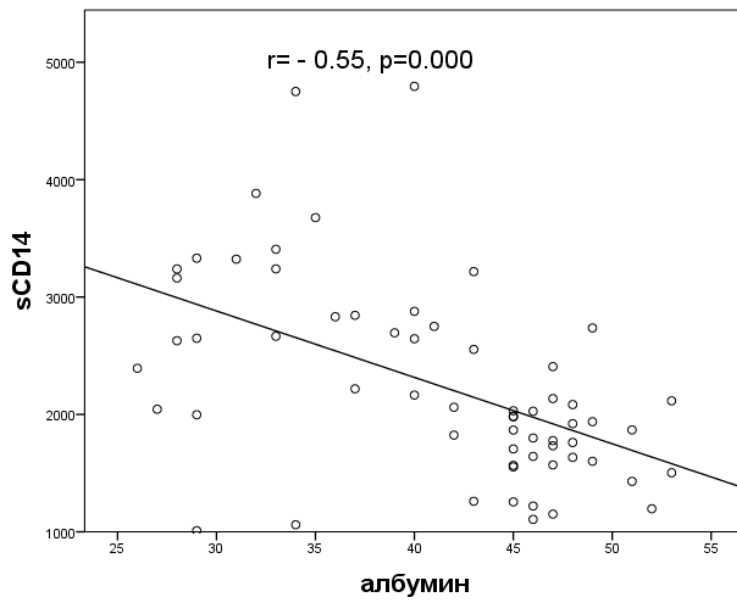
Установихме позитивна корелация на серумните нива на sCD14 с тежестта на фиброзата ( $r=0.62$ ,  $p=0.000$ , фиг.23 А), APRI-скора ( $r=0.57$ ,  $p=0.000$ ), билирубина ( $r=0.5$ ,  $p=0.000$ , фиг.23 Б) и INR ( $r=0.45$ ,  $p=0.000$ ), както и негативна със стойностите на албумина ( $r=-0.55$ ,  $p=0.000$ , фиг.23 В) и тромбоцитите ( $r=-0.58$ ,  $p=0.000$ , фиг.23 Г). Резултатите са показани следващата фигура.



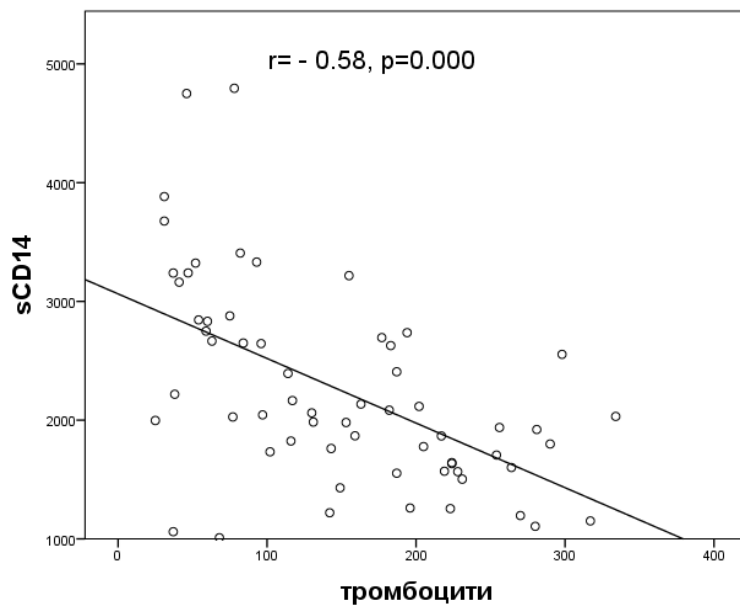
А.



Б.



В.

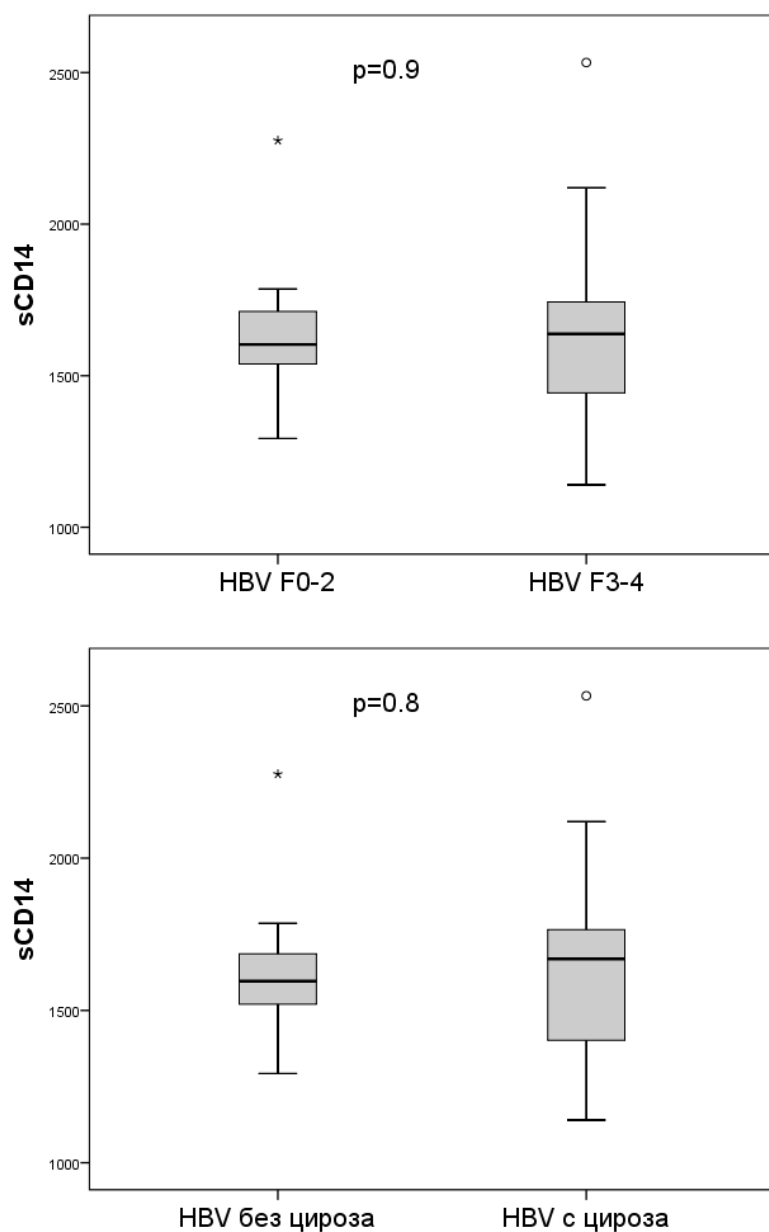


Г.

Фиг.23 Корелации между нивата на sCD14 и някои маркери за тежест на чернодробното заболяване

#### 4.2.5 sCD14 и тежест на фиброзата при пациенти с В вирусна инфекция

Не наблюдавахме значима разлика в серумните нива на sCD14 между пациентите с лека и напреднала фиброза ( $p=0.9$ ), както и между болните с и без чернодробна цирроза ( $p=0.8$ , фиг. 24).



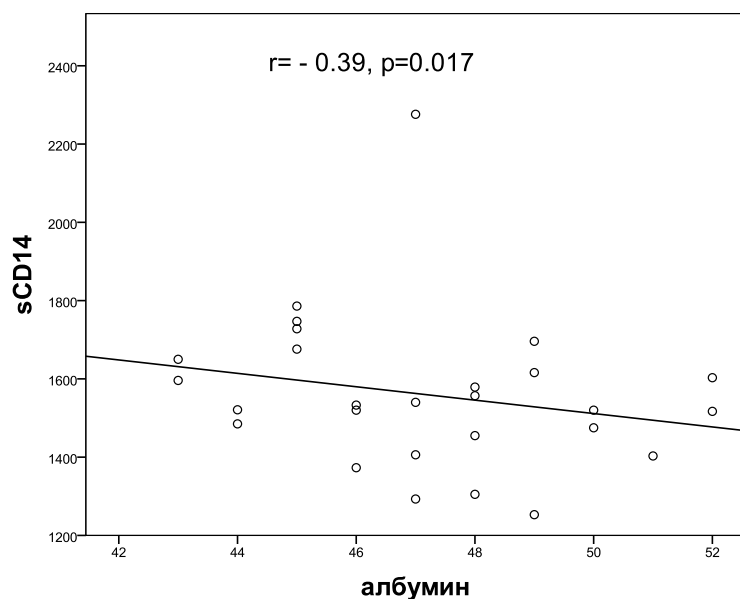
Фиг. 24 Нива на sCD14 при HBV пациенти с начална/напреднала фиброза, с/без цирроза

Групите с и без цироза не се различаваха значимо по стойностите на чернодробните ензими и показателите за тежест на чернодробното заболяване. (табл. 5)

Табл. 5 Сравнение на някои показатели при HBV без и с чернодробна цироза

|            | Без цироза          | С цироза            | p     |
|------------|---------------------|---------------------|-------|
|            | Медиана (iqr)       | Медиана (iqr)       |       |
| sCD14      | 1596<br>(1520-1696) | 1669<br>(1401-1769) | >0.05 |
| НОМА-IR    | 2.1<br>(1.7-3.9)    | 3.1<br>(1.6-4)      | >0.05 |
| hsCRP      | 2.4<br>(1.4-4.6)    | 1.6<br>(0.9-5.3)    | >0.05 |
| ИТМ        | 26.8<br>(23.8-29.4) | 24<br>(22-25.9)     | 0.042 |
| Общ бил.   | 9<br>(7-13)         | 13<br>(9-16)        | >0.05 |
| Албумин    | 47<br>(45-48)       | 45<br>(42-49)       | >0.05 |
| Тромбоцити | 234<br>(198-245)    | 153<br>(98-184)     | 0.000 |
| АСТ        | 23<br>(15-19)       | 27<br>(23-35)       | >0.05 |
| АЛТ        | 27<br>(15-55)       | 22<br>(19-33)       | >0.05 |
| ГГТ        | 21<br>(15-41)       | 22<br>(16-69)       | >0.05 |

Маркерът не корелираше със стадия на фиброзата, APRI-скора и показателите за тежест на чернодробното заболяване, освен слабо със стойностите на албумина ( $r = -0.39$ ,  $p = 0.017$ , фиг. 25).

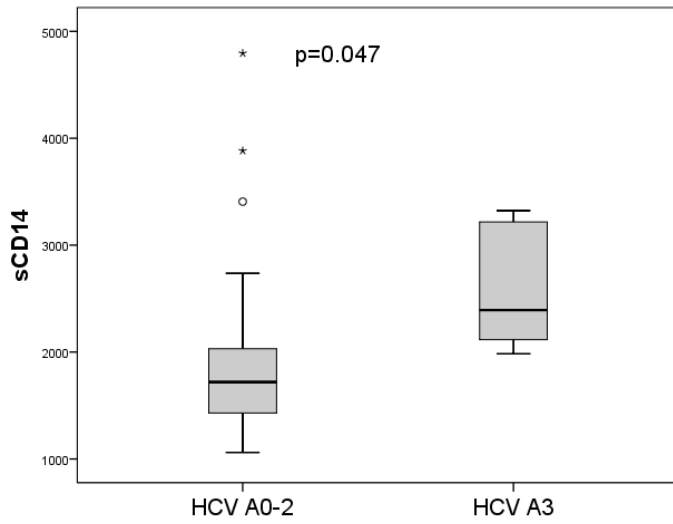


Фиг. 25 Корелация между нивата на sCD14 и албумин при HBV инфекция

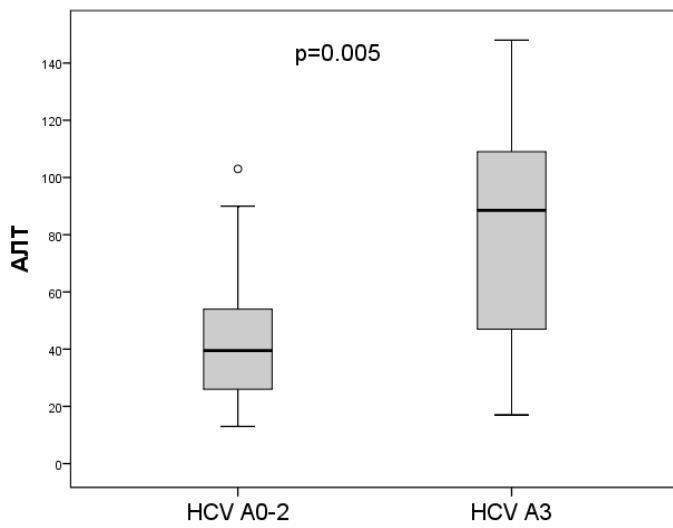
### 4.3 Оценка на връзката на sCD14 с хистологичната активност и маркерите за чернодробно и системно възпаление при хронична инфекция с хепатит С и В

#### 4.3.1 sCD14 и хистологичната активност при С вирусна инфекция

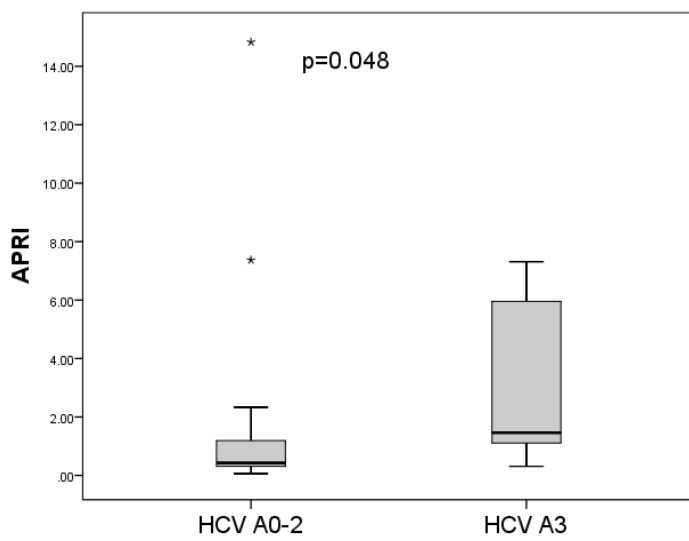
При пациентите с изразена хистологична активност (A3) установихме по-високи серумни нива на sCD14 в сравнение с болните с лекостепенна и умерена хистологична активност (A0-2) ( $p=0.047$ , фиг. 26 А). При тези болни наблюдавахме и значимо по-високи нива на цитолитичните ензими ( $p=0.016$  за АСТ и  $p=0.005$  за АЛТ, фиг. 26 Б), както и по-висок APRI-скор ( $p=0.048$ , фиг. 26 В). Пациентите не се различаваха по стойностите на билирубина, албумина, INR, тромбоцитите. Несигнификантна беше и разликата в стойностите на НОМА-индекса, общия холестерол и триглицеридите, индекса на телесната маса.



А.



Б.



В.

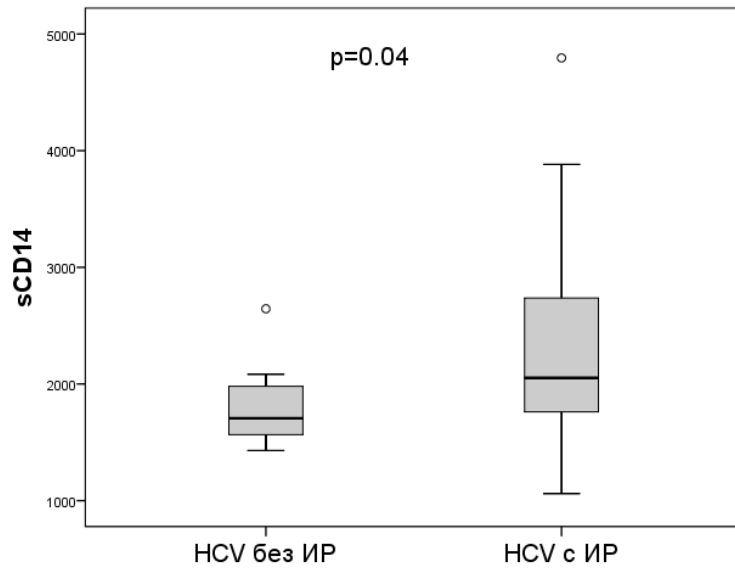
Фиг. 26 Разлика в нивата на sCD14, АЛТ, APRI-скара между пациенти с лекостепенна и изразена хистологична активност.

### 4.3.2 sCD14 и инсулинова резистентност при С вирусна инфекция

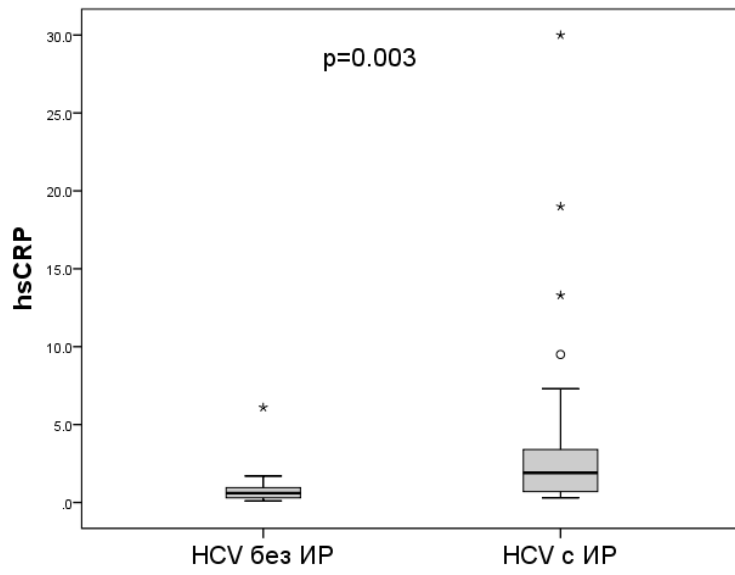
Наблюдавахме значимо по-високи нива на маркера при пациентите с инсулинова резистентност в сравнение с пациентите без инсулинова резистентност ( $p=0.04$ , фиг. 27 А), както и на АСТ (фиг. 27 Б), ГГТ, билирубина, индекса на телесната маса, hsCRP (фиг. 27 В), както и по-ниски на албумина и тромбоцитите. (табл. 6) Пациентите с инсулинова резистентност се отличаваха и с по-висока степен на фиброза ( $p=0.004$ , фиг. 27 Г).

Табл. 6 Сравнение на някои показатели между пациентите с HCV с и без инсулинова резистентност

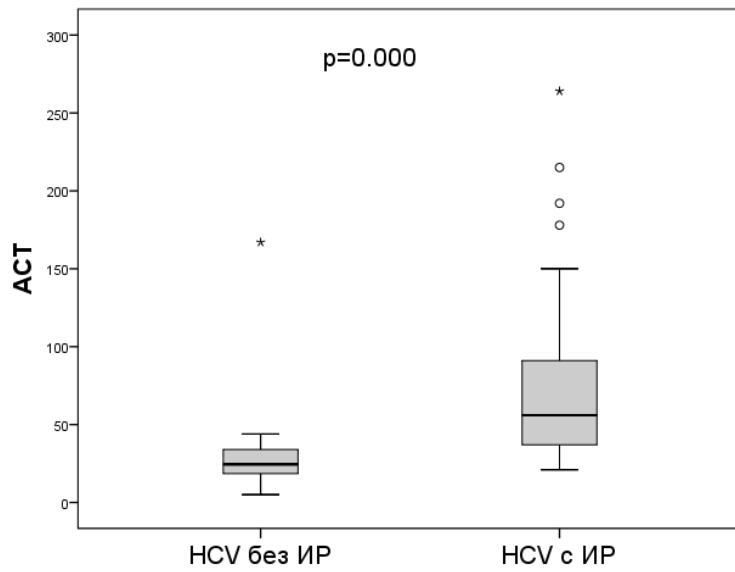
|            | Без ИР              | С ИР                | p     |
|------------|---------------------|---------------------|-------|
|            | Медиана (iqr)       | Медиана (iqr)       |       |
| sCD14      | 1706<br>(1560-2006) | 2053<br>(1754-2772) | 0.04  |
| hsCRP      | 0.6<br>(0.3-1)      | 1.9<br>(0.7-3.6)    | 0.003 |
| ИТМ        | 21.9<br>(20.7-23.9) | 26.2<br>(24.2-30.7) | 0.000 |
| APRI       | 0.33<br>(0.24-0.52) | 1.5<br>(0.5-3.9)    | 0.000 |
| Общ бил.   | 10<br>(8-13)        | 20<br>(9-36)        | 0.01  |
| Албумин    | 47<br>(45-50)       | 43<br>(33-47)       | 0.013 |
| Тромбоцити | 219<br>(156-259)    | 131<br>(78-203)     | 0.007 |
| АСТ        | 25<br>(19-38)       | 60<br>(36-105)      | 0.000 |
| АЛТ        | 29<br>(24-70)       | 53<br>(37-105)      | >0.05 |
| ГГТ        | 21<br>(14-53)       | 56<br>(28-86)       | 0.016 |



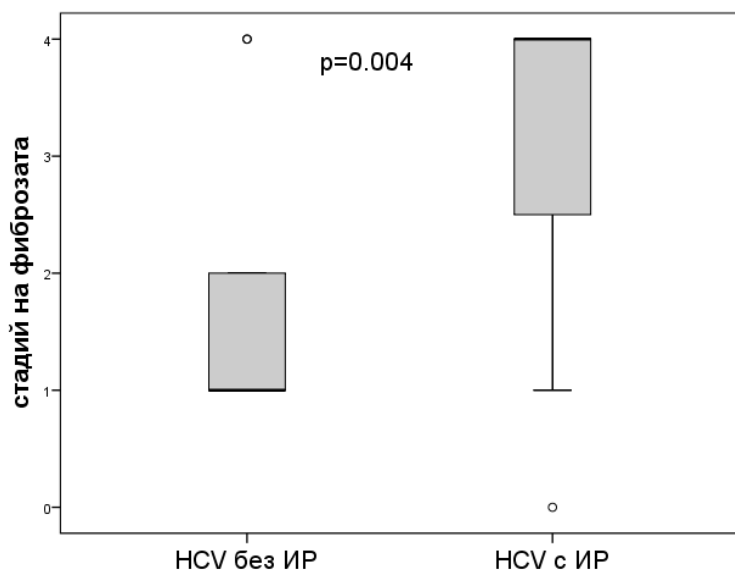
А.



Б.



В.

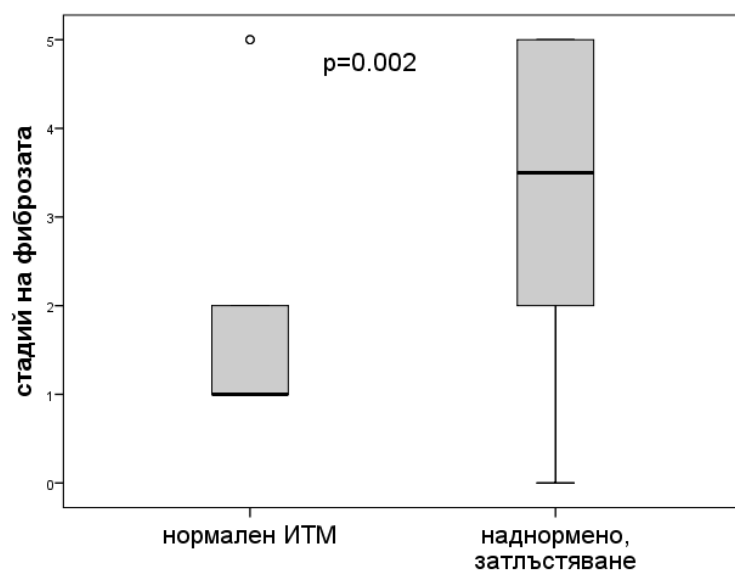
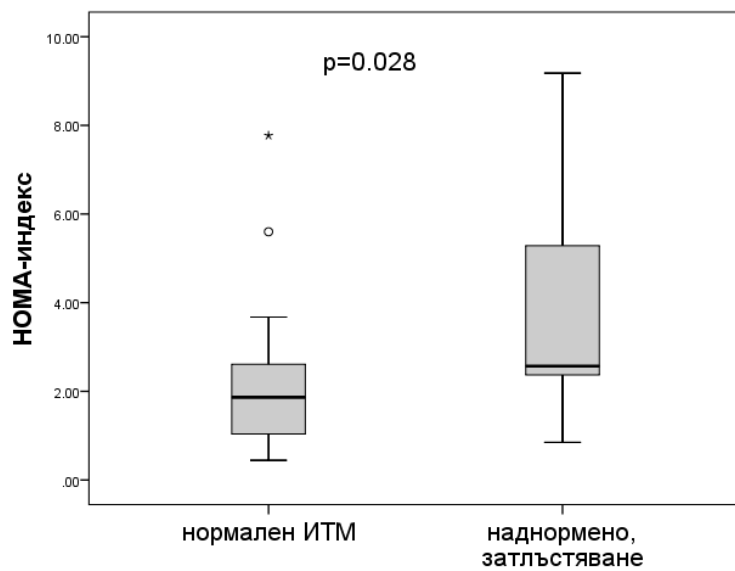
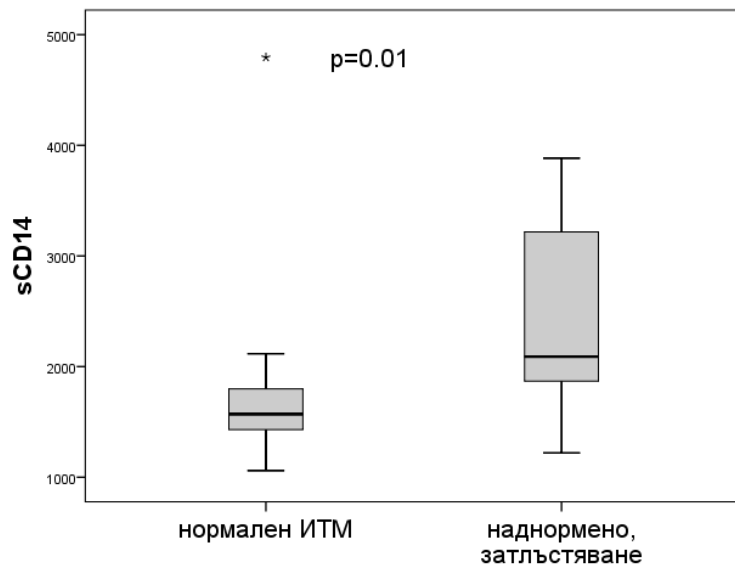


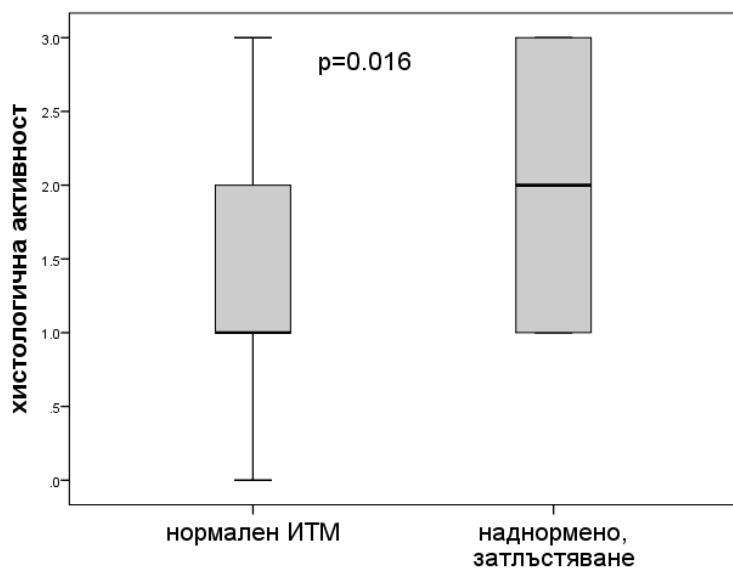
Г.

Фиг. 27 Разлика в нивата на sCD14, hsCRP, АСТ и стадия на фиброзата при HCV пациенти с/без инсулинова резистентност

#### 4.3.3 sCD14 и индекс на телесната маса при С вирусна инфекция

При пациентите с наднормено тегло и затлъстяване установихме значимо по-високи стойности на системните и чернодробни възпалителни маркери – sCD14 ( $p=0.01$ ), АСТ ( $p=0.009$ ), НОМА-индекса ( $p=0.028$ ), хистологичната активност ( $p=0.016$ ), както и по-изразена фиброза ( $p=0.002$ ), както и по-високи нива на билирубин ( $p=0.002$ ) и по-ниски на албумин ( $p=0.014$ ) и тромбоцити ( $p=0.017$ ).

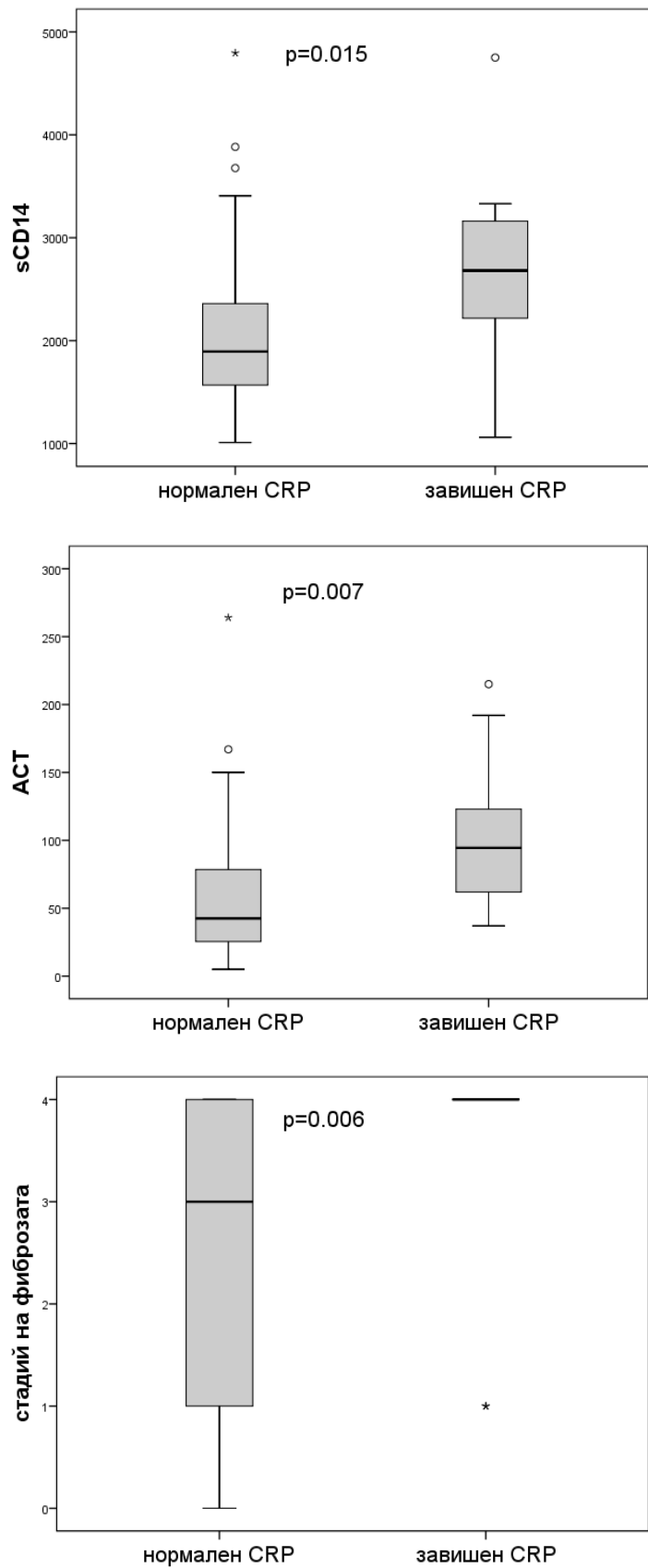




Фиг. 28 Разлика в нивата на sCD14, НОМА-индекса, стадия на фиброзата и хистологичната активност между HCV пациенти с нормален или повишен индекс на телесната маса

#### 4.3.4 sCD14 и hsCRP при пациентите с С вирусна инфекция

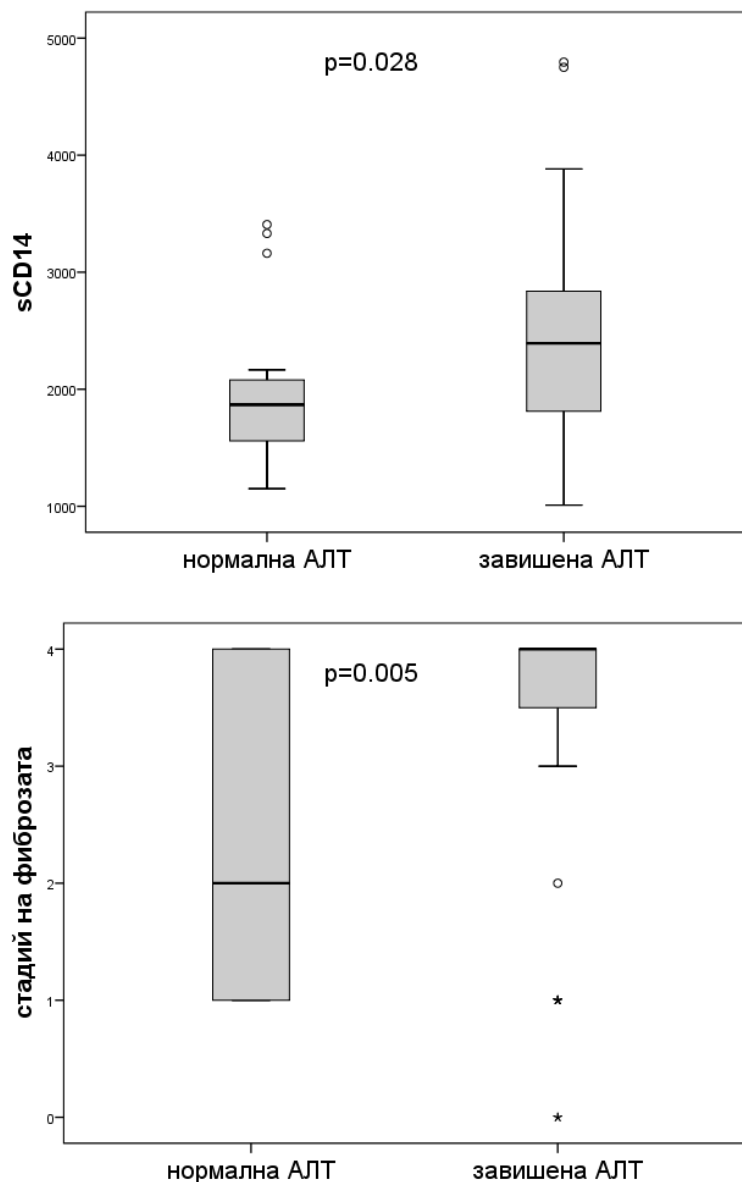
При пациентите с повишени стойности на hsCRP установихме значимо по-високи нива на sCD14 ( $p=0.015$ ) и АСТ ( $p=0.007$ ). Тези пациенти се отличават и с по-напреднала фиброза ( $p=0.006$ ) и показателите за тежест на чернодробното заболяване – по-високи стойности на билирубина ( $p=0.001$ ) и INR ( $p=0.004$ ), както и по-ниски албумин ( $p=0.001$ ) и тромбоцити ( $p=0.003$ ).



Фиг. 29 Разлика в стойностите на sCD14, АСТ и стадия на фиброзата между пациенти с нормален или повишен hsCRP

### 4.3.5 sCD14 и АЛТ при пациентите с С вирусна инфекция

При пациентите с повишена АЛТ наблюдавахме значимо по-високи нива на sCD14 ( $p=0.028$ ), по-напреднала фиброза ( $p=0.005$ ), както и маркери за тежест на чернодробното заболяване – по-високи нива на билирубин ( $p=0.024$ ) и INR ( $p=0.038$ ), по -ниски албумин ( $p=0.039$ ) и тромбоцити ( $p=0.006$ ).



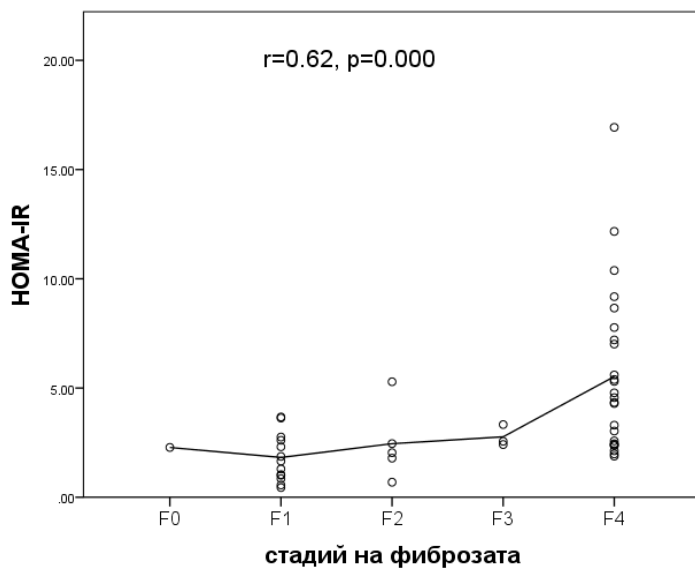
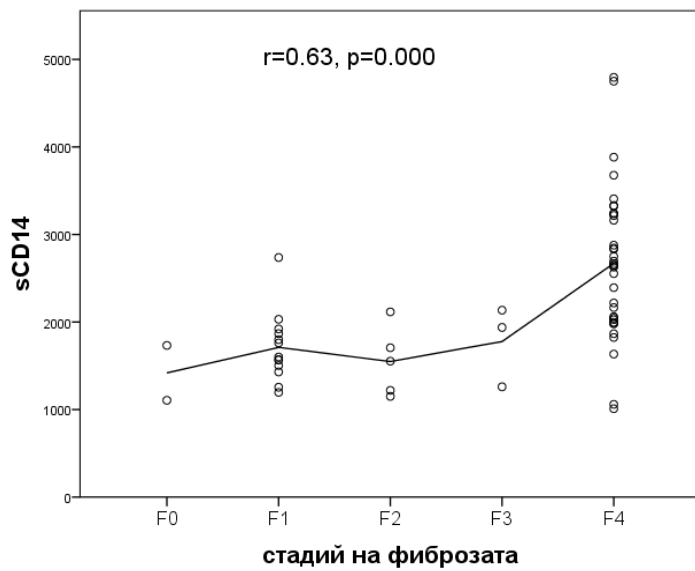
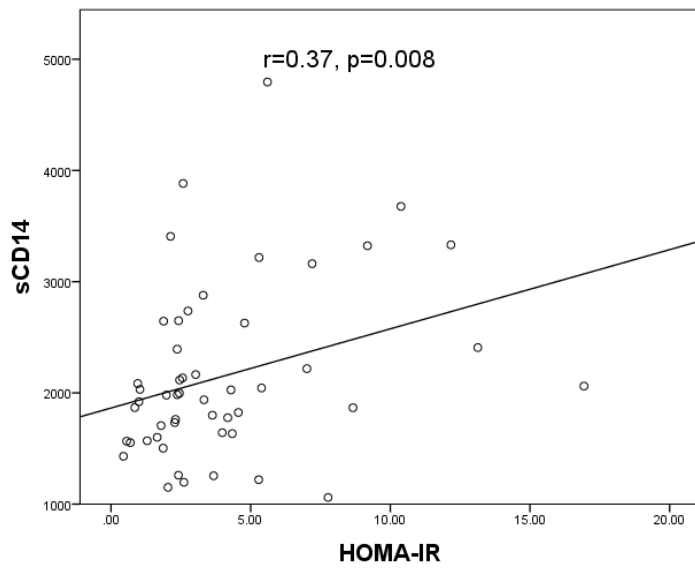
Фиг. 30 Разлика в sCD14 и стадия на фиброзата при пациенти с нормална и завишена АЛТ

#### 4.3.6 Корелации между маркерите за чернодробно и системно възпаление при пациентите с С вирусна инфекция

Серумните нива на sCD14 корелираха позитивно с НОМА-индекса ( $r=0.37$ ,  $p=0.008$ ), индекса на телесната маса ( $r=0.43$ ,  $p=0.003$ ), hsCRP ( $r=0.27$ ,  $p=0.039$ ), цитолитичните ензими и ГГТ ( $r=0.47$ ,  $p=0.000$  за АСТ). Отделните маркери за чернодробна и системна възпалителна активност корелираха позитивно и помежду си, както и с тежестта на фиброзата. (табл. 7)

Табл. 7 Корелации между някои възпалителни маркери, sCD14 и стадия на фиброзата

|                     |                 | <b>sCD14</b>           | <b>НОМА-<br/>IR</b>    | <b>ИТМ</b>             | <b>hsCRP</b>           | <b>АСТ</b>             |
|---------------------|-----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>НОМА-<br/>IR</b> | <b>r</b><br>(p) | <b>0.37</b><br>(0.008) |                        |                        |                        |                        |
| <b>ИТМ</b>          | <b>r</b><br>(p) | <b>0.43</b><br>(0.003) | <b>0.35</b><br>(0.022) |                        |                        |                        |
| <b>hsCRP</b>        | <b>r</b><br>(p) | <b>0.27</b><br>(0.039) | <b>0.33</b><br>(0.021) | <b>0.44</b><br>(0.003) |                        |                        |
| <b>АСТ</b>          | <b>r</b><br>(p) | <b>0.47</b><br>(0.000) | <b>0.57</b><br>(0.000) | <b>0.37</b><br>(0.013) | <b>0.33</b><br>(0.009) |                        |
| <b>Фиброза</b>      | <b>r</b><br>(p) | <b>0.63</b><br>(0.000) | <b>0.62</b><br>(0.000) | <b>0.45</b><br>(0.003) | <b>0.32</b><br>(0.017) | <b>0.69</b><br>(0.000) |



Фиг. 31 Корелация на sCD14 и НОМА-индекса със стадия на фиброзата и помежду им

#### **4.3.7 sCD14 и маркери за чернодробна и системна възпалителна активност при хроничната В вирусна инфекция**

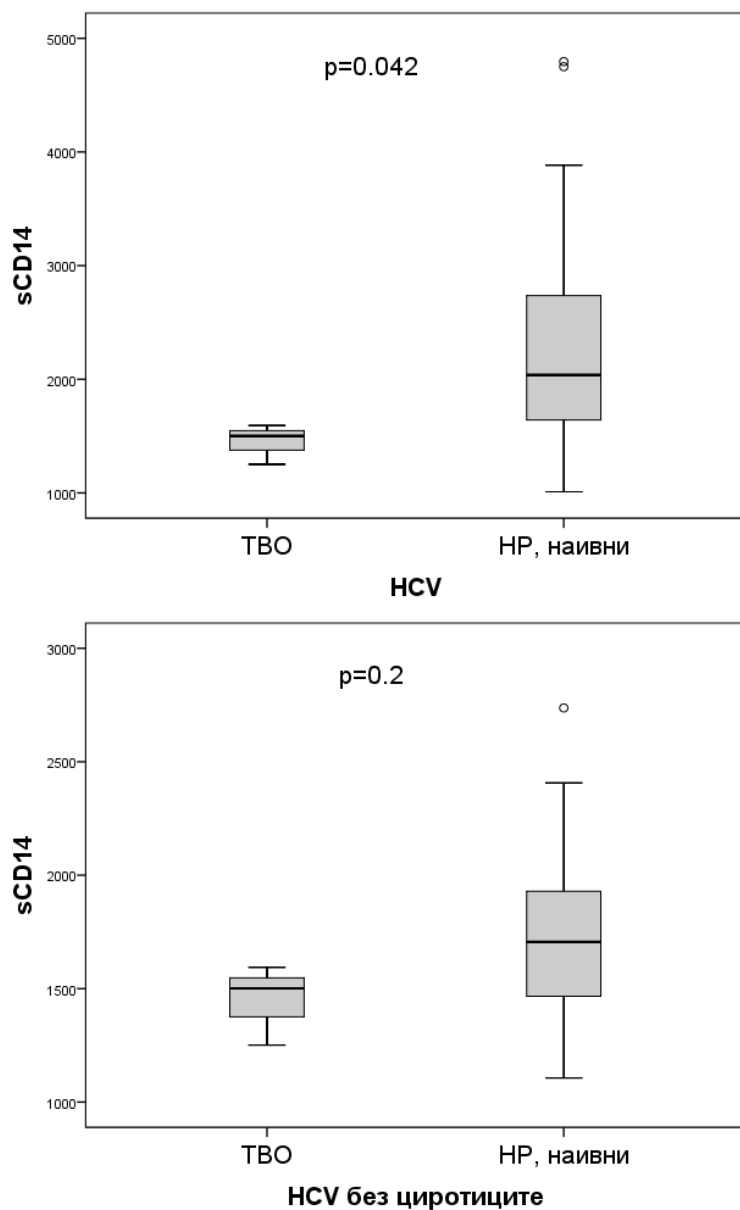
Не установихме значима разлика в серумните нива на sCD14 по отношение на степента на хистологичната активност ( $p=0.35$ ), наличието или не на инсулинова резистентност ( $p=0.6$ ), завишена АЛТ ( $p=0.5$ ) и hsCRP ( $p=0.7$ ).

Стойностите на маркера не корелираха сигнификантно с показателите за системна или чернодробна възпалителна активност.

#### **4.4 Оценка на sCD14 във връзка с терапевтичния отговор при хепатит С инфекция, показанията за терапия при хепатит В инфекция**

##### **4.4.1 Разлика в стойностите на маркера между пациентите с излекувана и неизлекувана С вирусна инфекция**

Наблюдавахме значимо по-ниски серумни нива на sCD14 при пациентите с постигнат ТВО в сравнение с наивните пациенти и нон-респондърите ( $p=0.042$ ). Разликата загуби значимост след изключване на пациентите с чернодробна цироза ( $p=0.2$ ). След премахване на циротиците, двете групи се различаваха сигнификантно по стойностите на APRI-скора ( $p=0.03$ ), АСТ ( $p=0.02$ ) и АЛТ ( $p=0.002$ ) (по-високи в групата без ТВО), без разлика в стадия на фиброзата, хистологичната активност, възпалителните маркери, инсулиновата чувствителност и индекса на телесната маса, възрастта и маркерите за тежест на чернодробното увреждане. Нивата на sCD14 не се различаваха между нон-респондърите и наивните пациенти ( $p=1$ ). При последващата обработка на данните пациентите с постигнат траен вирусологичен отговор бяха изключени от анализа.

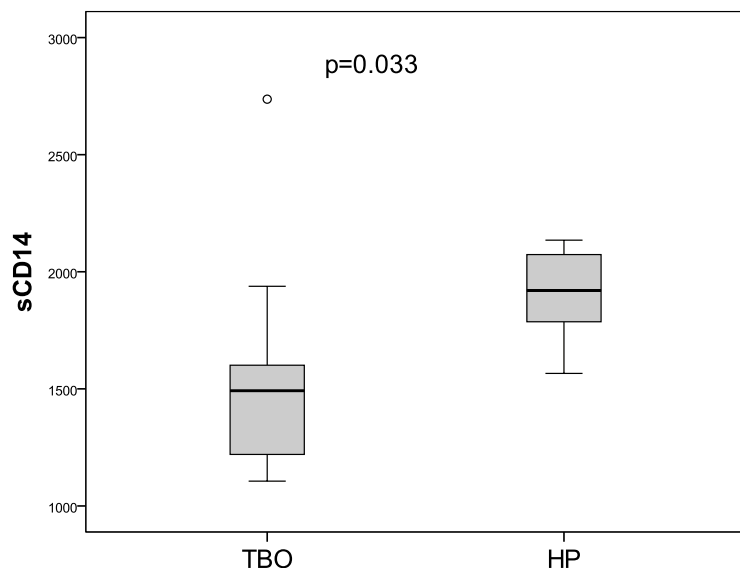


Фиг. 32 Разлика в нивата на sCD14 между излекувани пациенти и пациенти с HCV инфекция

#### 4.4.2 Значение на изходните нива на sCD14 за терапевтичния отговор при хронична С вирусна инфекция

Изследвахме предиктивната роля на изходните нива на sCD14 за постигането на ТВО при пациентите с хепатит С инфекция. Установихме значимо по-ниски изходни нива на маркера при отговорилите на интерфероново лечение спрямо нон-респондърите ( $p=0.033$ ). Двете групи не се различаваха сигнификантно по стадия на фиброзата, хистологичната активност,

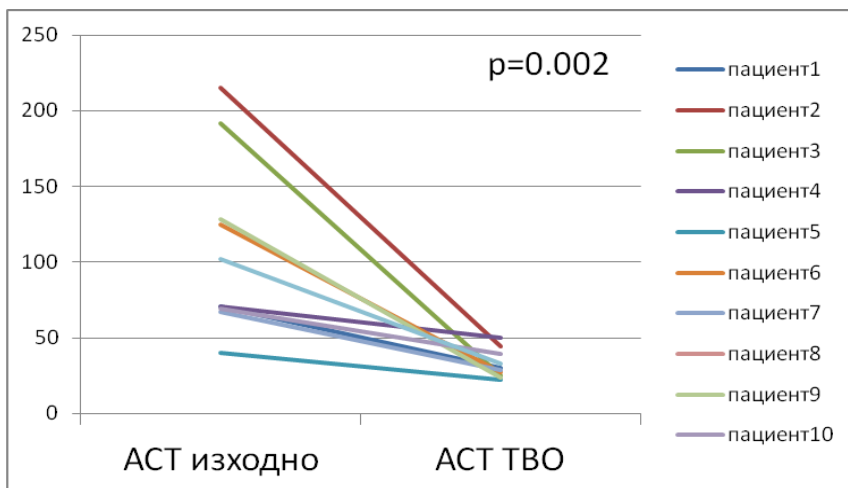
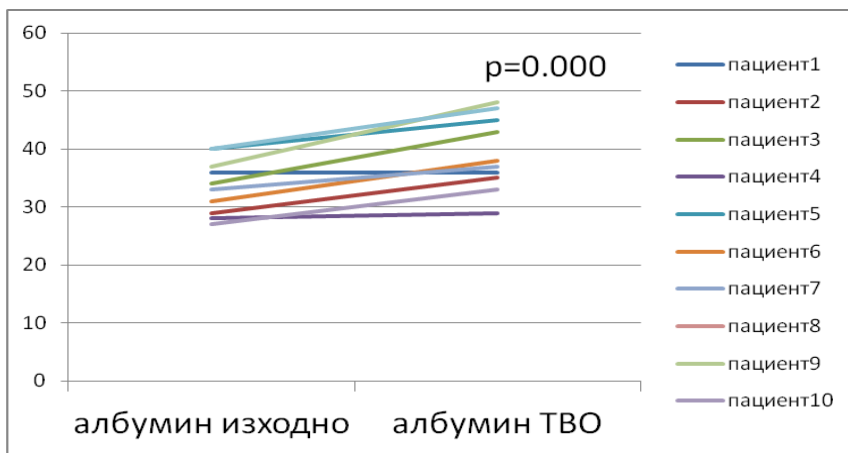
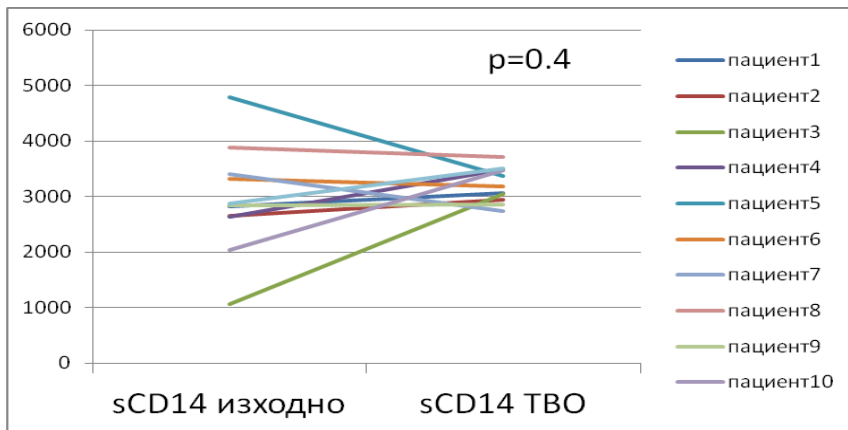
цитолитичните ензими, нивото на изходната виремия, показателите за тежест на чернодробното заболяване, инсулиновата резистентност, индекса на телесната маса и възпалителните маркери.



Фиг. 33 Изходни нива на sCD14 и терапевтичен отговор към Интерферон-базиран режим при HCV

#### 4.4.3 Разлика в серумните нива на sCD14 изходно и след постигане на ТВО на фона на безинтерферонова терапия

Проследихме нивата на sCD14, трансаминазите и маркерите за тежест на чернодробното заболяване изходно и след постигане на ТВО при 10 пациента лекувани с безинтерферонови режими. Докато с постигането на ТВО наблюдавахме значимо покачване в стойностите на албумина ( $p=0.000$ ) и спад в стойностите на трансаминазите ( $p=0.002$ ), отчетлива промяна в серумните нива на sCD14 не се наблюдава ( $p=0.4$ ). (фиг. 34) Не наблюдавахме значима промяна и в стойностите на билирубина, тромбоцитите, INR.

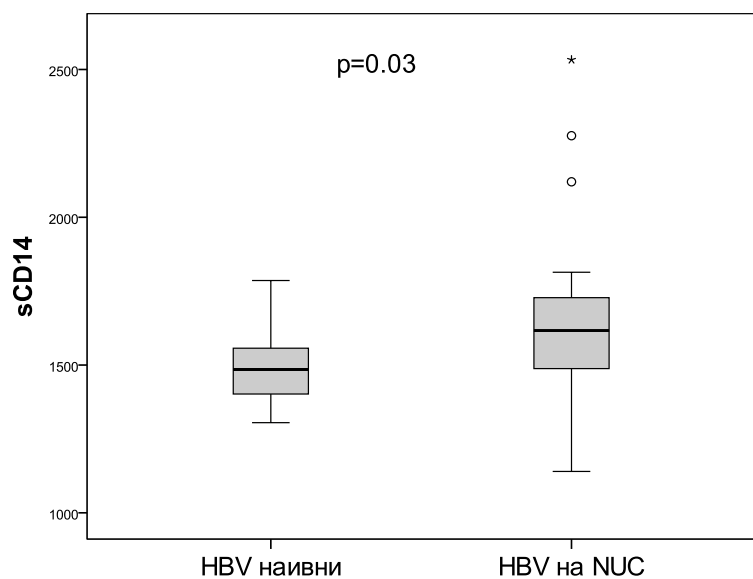


Фиг. 34 Динамика в стойностите на sCD14, албумин и АСТ преди и след постигане на ТВО при 11 пациенти с HCV цирроза на безинтерферонова терапия

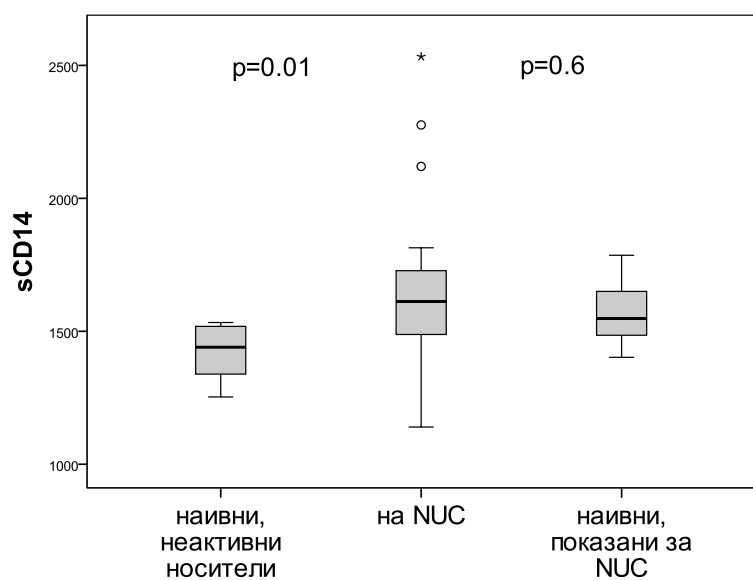
#### **4.4.4 Връзка на серумните нива на sCD14 с показанията за терапия при хронична В вирусна инфекция**

Установихме значимо по-ниски нива на sCD14 при наивните спрямо пациентите на терапия с NUC ( $p=0.04$ ). (фиг. 35 А) Двете групи се различаваха и по стадия на фиброзата ( $p=0.027$ ) и нивото на виремията (по-ниска при пациентите на терапия с NUC,  $p=0.000$ ). (табл. 8)

Разликата в нивата на sCD14 остана сигнификантна между неактивните носители спрямо пациентите на терапия с NUC ( $p=0.033$ ) и загуби сигнификантност при сравнение на бте наивни пациента с показания за терапия с пациентите на терапия ( $p=0.5$ ). (фиг. 35 Б)



А.



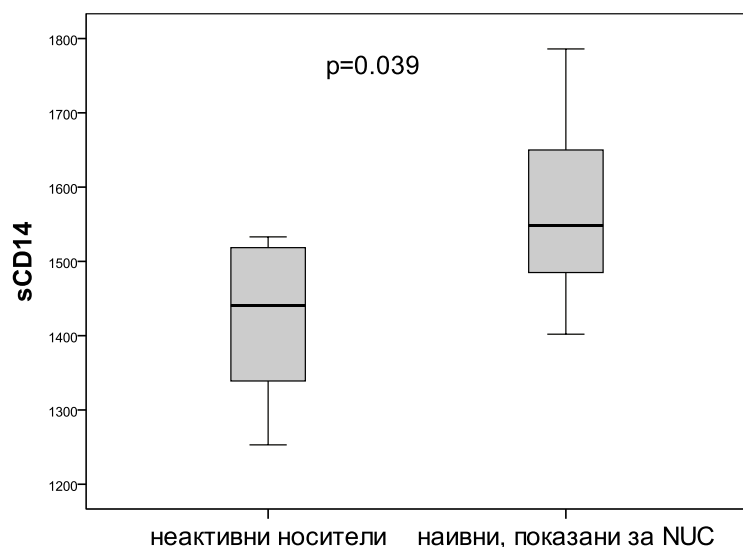
Б.

Фиг. 35 Разлика в нивата на sCD14 А. между наивните HBV пациенти и тези на терапия с NUC, Б. между пациентите на терапия с NUC и съотв. неактивните носители и наивните пациенти, показани за терапия

Табл. 8 Разлика в някои показатели между наивните HBV пациенти и тези на терапия с NUC

|            | <b>Наивни</b>                             | <b>На NUC</b>                                 | <b>p</b> |
|------------|---|---|----------|
|            | <i>Средна Стойност<br/>(Станд. откл.)</i> | <i>Средна<br/>Стойност<br/>(Станд. откл.)</i> |          |
| sCD14      | 1486 (137)                                | 1648 (279)                                    | 0.04     |
| НОМА-IR    | 3 (1.8)                                   | 3.9 (6.1)                                     | >0.05    |
| hsCRP      | 3.5 (2.8)                                 | 2.9 (3.1)                                     | >0.05    |
| Фиброза    | 2 (1)                                     | 3.5 (1)                                       | 0.002    |
| Хист. Акт. | 1 (0.5)                                   | 1.7 (0.5)                                     | >0.05    |
| Общ бил.   | 17 (23)                                   | 12 (5)  | >0.05    |
| Албумин    | 47 (3)                                    | 46 (4)  | >0.05    |
| Тромбоцити | 221 (69)                                  | 187 (56)                                      | >0.05    |
| АСТ        | 39 (36)                                   | 26 (11)                                       | >0.05    |
| ГГТ        | 33 (15)                                   | 33 (28)                                       | >0.05    |
| HBV DNA    | 4.8 (2.3)                                 | 0.4 (1.7)                                     | 0.000    |

В групата на наивните пациенти наблюдавахме значимо по-ниски серумни нива на sCD14 при неактивните носители в сравнение с пациентите с показания за започване на терапия ( $p=0.04$ , фиг. 36), като двете групи се различаваха и по стойностите на АСТ ( $p=0.004$ ) и албумина ( $p=0.01$ ), както и спрямо стойностите на виремията ( $p=0.001$ ). (табл. 9) Не установихме корелация на маркера с виремията, стойността на фиброзата, хистологичната активност, цитолитичните ензими и показателите за синтетична чернодробна функция в тази група.

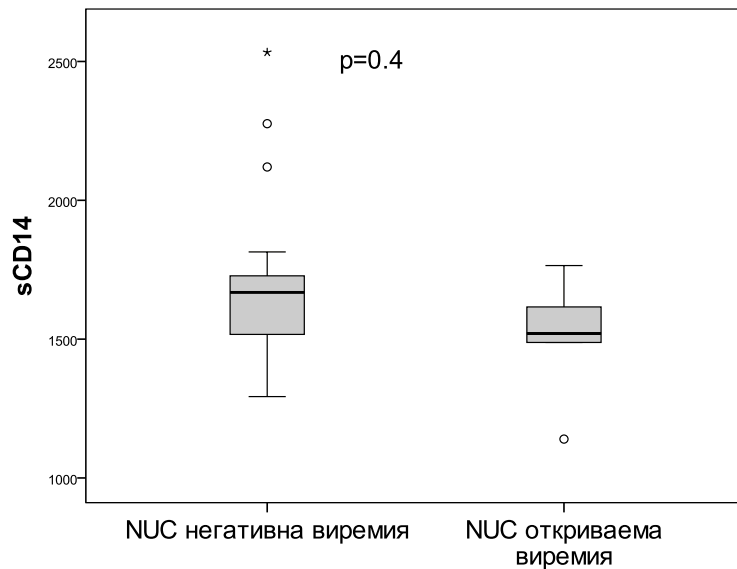


Фиг. 36 Разлика в нивата на sCD14 между неактивните носители и наивните пациенти с показания за терапия

Табл. 9 Разлика в стойностите на някои показатели между неактивните носители на В вируса и наивните пациенти, показани за терапия с NUC

|            | <b>Наивни,<br/>неактивни<br/>носители</b> | <b>Наивни,<br/>показани за<br/>терапия</b>    | <b>p</b> |
|------------|---|---|----------|
|            | <i>Средна Стойност<br/>(Станд. откл.)</i> | <i>Средна<br/>Стойност<br/>(Станд. откл.)</i> |          |
| sCD14      | 1423 (106)                                | 1570 (134)                                    | 0.04     |
| НОМА-IR    | 3.3 (2.1)                                 | 2.6 (1.4)                                     | >0.05    |
| hsCRP      | 2.6 (2.5)                                 | 4.7 (3)                                       | >0.05    |
| Фиброза    | 1 (0.5)                                   | 2.5 (1.5)                                     | >0.05    |
| Общ бил.   | 13 (4)                                    | 23 (36)                                       | >0.05    |
| Албумин    | 49 (2)                                    | 45 (3)  | 0.01     |
| Тромбоцити | 235 (67)                                  | 201 (72)                                      | >0.05    |
| АСТ        | 23 (10)                                   | 60 (47)                                       | 0.004    |
| ГГТ        | 31 (13)                                   | 35 (17)                                       | >0.05    |
| HBV DNA    | 3.4 (0.9)                                 | 6.8 (2.1)                                     | 0.001    |

При пациентите, приемащи нуклеозиден/нуклеотиден аналог, не установихме разлика в стойностите на sCD14 между пациентите с негативна и откриваема вирусемия ( $p=0.4$ ). (фиг. 37) Двете групи се различаваха единствено по серумните нива на АЛТ ( $p=0.007$ ).

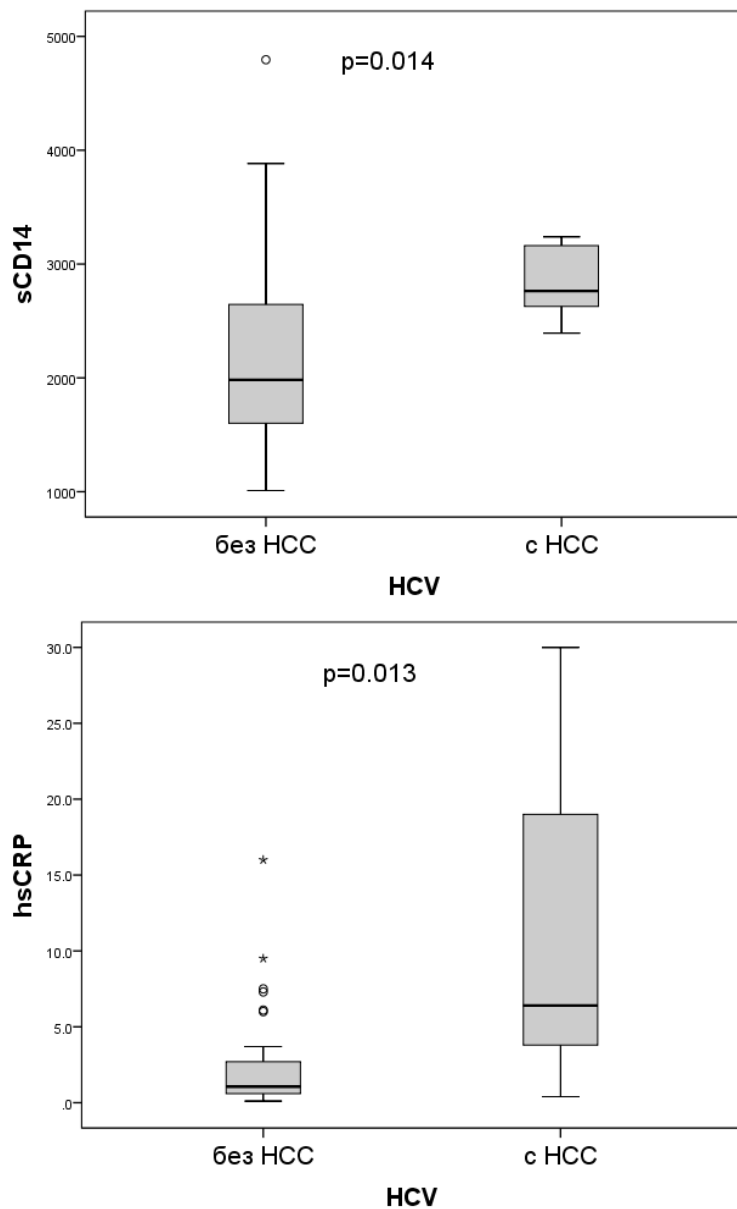


Фиг. 37 Серумни нива на sCD14 при HBV пациенти на терапия с NUC с негативна или откриваема вирусемия

## **4.5 Оценка на серумните нива sCD14 при някои усложнения на чернодробната цироза**

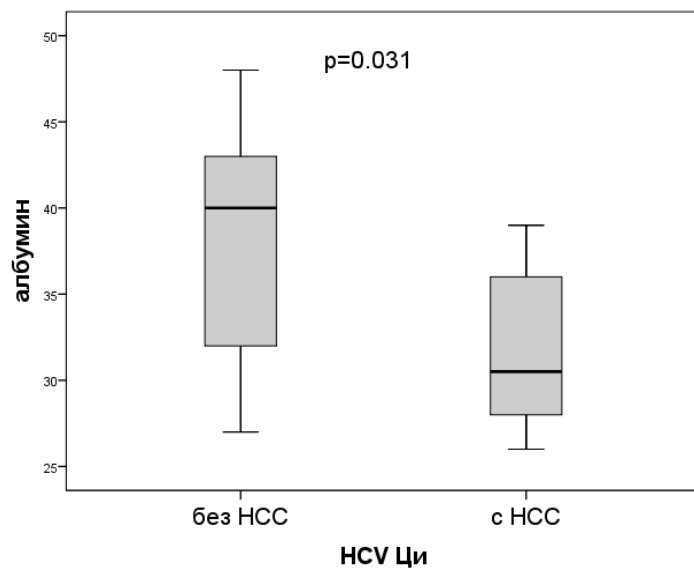
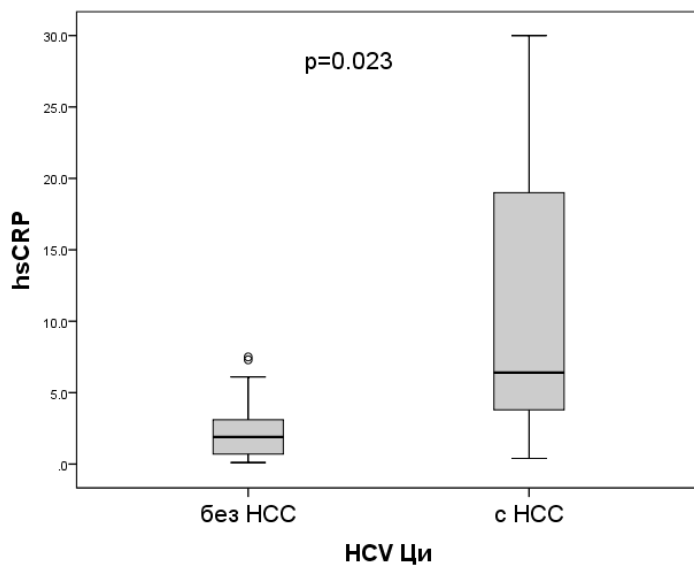
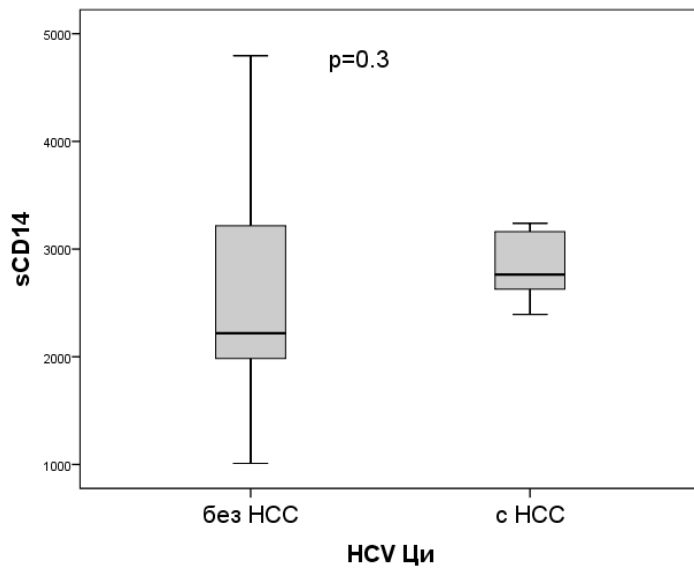
### **4.5.1 sCD14 и хепатоцелуларен карцином**

В хода на проследяването при 6 пациенти се установи хепатоцелуларен карцином (HCC). Установихме значимо по-високи нива на sCD14 при пациентите с HCC спрямо останалите пациенти с С вирусна инфекция ( $p=0.014$ ). При тези пациенти наблюдавахме и значимо по-високи нива на hsCRP ( $p=0.013$ ) и директния билирубин (0.03), както и по-ниски нива на албумина ( $p=0.002$ ). (фиг. 38)



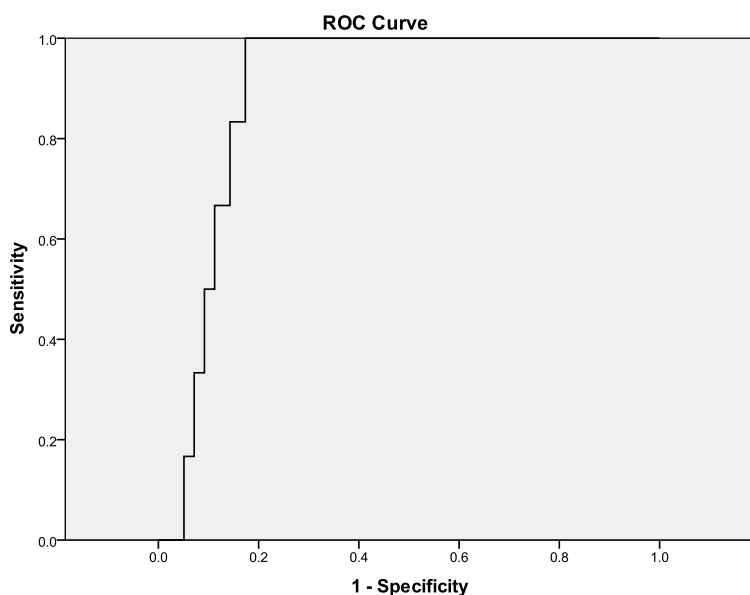
Фиг. 38 Разлика в нивата на sCD14 и hsCRP при HCV пациенти с и без хепатоцелуларен карцином

Пациентите с HCC не се различаваха значимо от останалите циротици по отношение нивата на sCD14 ( $p=0.3$ ), като имаха значимо по-високи нива на hsCRP ( $p=0.023$ ) и по-ниски на албумина ( $p=0.031$ ). (фиг. 39)



Фиг. 39 Разлика нивата на sCD14, hsCRP и албумин при HCV цирроза с и без хепатоцелуларен карцином

Прведохме ROC-анализ за установяване на чувствителността и специфичността на sCD14 като маркер за хепатоцелуларен карцином при хронична С или В вирусна инфекция. Установихме площ под кривата 0.893 (при доверителен интервал 0.829-0.957, стандартна грешка 0.033,  $p=0.001$ ). Установихме, че при серумни нива на sCD14 2334.5 pg/ml чувствителността за установяване на НСС е 100 %, при специфичност 82.7 %.



Фиг. 40 ROC – анализ – sCD14 като маркер за хепатоцелуларен карцином при хронична вирусна С и В инфекция

Пациентите, които впоследствие починаха имаха значимо по-високи нива на sCD14 ( $p=0.016$ ) и hsCRP ( $p=0.008$ ) в сравнение с останалите пациенти с С вирусна инфекция (изключени са пациентите с НСС и портална енцефалопатия). Разликата не беше сигнификантна спрямо останалите циротици ( $p=0.07$ ).

Четиримата пациенти с изявена портална енцефалопатия не се различаваха по стойностите на sCD14 от останалите циротици ( $p=0.7$ ), различаваха се единствено по по-ниските нива на албумина ( $p=0.002$ ).

## 5 ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Настоящото изследване е първото в България, оценяващо бактериалната транслокация и предизвиканата от нея имунната активация при пациенти с хронична вирусна С и В инфекция.

Нашите резултати сочат, че серумните нива на ЛПЗ не са подходящ маркер за оценка на бактериалната транслокация при хронична С и В вирусна инфекция, което съответства на данните от световната литература. Установено е, че не количеството преминал в кръвообращението ЛПЗ определя прогресията на хроничните чернодробни заболявания, а предизвиканият от него имунен отговор. Описано е, че степента на експресия на TLR-4 – рецепторът, медиращ ефектите на ЛПЗ в черния дроб – може да е подлежащият механизъм за по-бързата прогресия на чернодробното заболяване при някои болни.

Наблюдавахме значимо по-високи серумни нива на sCD14 при пациентите с С вирусна инфекция спрямо пациентите с В вирусна инфекция и здравите контроли. Тази разлика беше за сметка на пациентите с чернодробна цироза и след изключване на циротиците стана несигнификантна. При хепатит С инфекция е описана загуба на TLR-толеранс под действието на С-вирусният кор протеин, ЛПЗ и Интерферон гама. Това води до персистираща активация на периферните моноцити и Купферовите клетки от преминалия в кръвообращението ЛПЗ и персистиране на системна и чернодробна възпалителна активност в организма.

В групата с С вирусна инфекция високите стойности на sCD14 отдиференцираха пациентите с чернодробна цироза. Тази находка не беше за сметка на декомпенсираните циротици, а беше значима и за пациентите с неусложнена цироза –компенсирана болест, без изявена портална хипертония, без варици на хранопровода. Тези пациенти имаха значимо по-високи серумни нива на sCD14 от пациентите без цироза, както и в сравнение с пациентите с напреднала фиброза (F3-4), но без развита цироза. Освен тежките промени в чревната пропускливост, мотилитет и порталното шънтиране при напреднала болест, са описани нарушения и в ранните стадии на цирозата. Наблюдават се

промени в чревната флора при циротици, с намален относителен дял на някои бенефициентни щамове, което благоприятства прикрепването на патогенни бактерии към чревната стена и улеснява транслокацията им. Открити са придобити дефекти във вродения и адаптивен имуен отговор – повишена активност на противовъзпалителни цитокини, намален фагоцитарен капацитет, повишен синтез на профибротични цитокини. Тези промени от една страна благоприятстват напредването на фиброзата, развитието на бактериален свръхрастеж и бактериална транслокация, а от друга намаляват капацитета на организма за справяне с транслокираните бактерии.

Не установихме значима разлика в нивата на маркера за бактериална транслокация по отношение тежестта на цирозата и порталната хипертония. При напредналата болест нараства честотата на усложненията, изискващи прием на антибиотик, а наличието на изразена портална хипертония и високорискови варици е свързано с прием на Пропранолол. Известно е, че чревната деконтаминация намалява степента на бактериална транслокация. Има данни за благоприятен ефект върху БТ и от приема на Пропранолол – на базата на намаляване степента на порталната хипертония и ускоряване на оро-цекалното транзитно време. Оценихме болните в отделните групи според приема на тези медикаменти и не установихме значима разлика в стойностите на възпалителните маркери. Наблюдавахме тенденция към по-ниски серумни нива на sCD14 и hsCRP при декомпенсираните циротици, приемащи Пропранолол спрямо болните, които не примат медикамента.

sCD14 корелираше със стадия на фиброзата, както и маркерите за тежест на чернодробното заболяване. По-високите нива на маркера за бактериална транслокация съответстваха на по-тежка болест. Установихме корелация и с маркерите за чернодробно възпаление – цитолитичните ензими и системно възпаление – hsCRP и НОМА-индекса. Пациентите с повишена АЛТ, hsCRP и данни за инсулинова резистентност имаха значимо по-високи серумни нива на sCD14 спрямо пациентите с нормални стойности на маркерите. Освен това възпалителните маркери корелираха помежду си, както и с тежестта на

фиброзата, което е в съответствие с данни от литературата за повишена системна възпалителна активност и бактериална транслокация при пациентите с по-тежка чернодробна болест. От една страна напредналата болест благоприятства преминаването на бактериални продукти в кръвообращението, а от друга – ЛПЗ и последващата имунна активация и синтез на провъзпалителни цитокини, вкл. TNF-a и TGF-b, активират Купферовите клетки и чернодробните звездовидни клетки към фиброгенеза.

При пациентите с В вирусна инфекция не установихме разлика в стойностите на sCD14 между циротиците и останалите болни, както и разлика по отношение на възпалителната активност. В момента на включване в изследването пациентите с цироза бяха на терапия с NUC, с постигнат цитолитичен и вирусологичен контрол и с компенсирана болест – Чайлд В беше само един пациент.

Интересно беше да се оцени връзката на бактериалната транслокация и инсулиновата резистентност при пациентите с хронични вирусни хепатити и особено хепатит С инфекция. Хепатит С вирусът чрез кор-протеина си и чернодробната възпалителна активност води до развитие на чернодробна а по-късно и периферна инсулинова резистентност, докато с постигането на траен вирусологичен отговор инсулиновата чувствителност се подобрява. Инсулиновата резистентност и диабетът от своя страна увеличават риска за развитие на декомпенсация на болестта и хепатоцелуларен карцином, като рискът персистира дори след изчистване на вируса. Описана е ролята на бактериалната транслокация в патогенезата на инсулиновата резистентност, чрез синтеза на провъзпалителни цитокини. При пациентите с по-изразена фиброза установихме по-високи нива на инсулинова резистентност, а при пациентите с инсулинова резистентност – по-изразена фиброза. sCD14 и НОМА-индексът корелираха слабо помежду си, както и по-силно със стадия на фиброзата. Това говори, че бактериалната транслокация може да са кофактори за напредването на болестта, или че и двете са следствие от по-тежката степен на чернодробната фиброза. TLR-4 чрез синтеза на провъзпалителни цитокини под въздействието

на преминал в кръвообращението ЛПЗ е свързващото звено между БТ, прогресията на чернодробната фиброза и инсулиновата резистентност.

Изследвахме предиктивната роля на изходните нива на sCD14 за постигането на ТВО при пациентите с хепатит С инфекция. Установихме връзка между по-високите изходни нива на маркера и последващия неуспех от интерференова терапия. Групите на отговорилите и неотговорилите на лечението не се различаваха сигнификантно по други показатели определящи терапевтичния отговор – ИТМ, инсулинова резистентност, ниво на вiremията, както и по стойностите на маркерите за тежест на чернодробното заболяване и възпалителна активност. Данните са в съответствие с други научни съобщения, като други автори са отдали по-високите изходни нива на маркера при неотговорилите на по-напредналата фиброза при тези болни.

Проследихме стойностите на sCD14 след постигане на ТВО при 11 болни с чернодробна цироза, провели безинтерференово лечение. Не установихме значим спад в нивата на маркера след края на терапията, като наблюдавахме подобрене по отношение на чернодробните ензими и албумина. Други автори също са установили, че sCD14 не намалява 2 години след успешна терапия. Това може да се обясни с по-напредналата болест при тези болни. При пациентите с чернодробна цироза персистират налична ИР и рискът за развитие на НСС, въпреки намалението на честотата на възникване на диабетни усложнения, чернодробната и общата смъртност.

В групата с хепатит В инфекция установихме значимо по-ниски нива на sCD14 при неактивните носители на вируса в сравнение с пациентите с показания за терапия, както и с тези на терапия с NUC. Наблюдавахме по-напреднала фиброза при пациентите на противовирусна терапия, което може да обясни разликата в нивата на маркера. Последният не се различаваше между пациентите с негативна и откриваема вiremия и не корелираше с нивата на HBV DNA при наивните пациенти. Други автори са описали негативна корелация с HBsAg, както и по-високи нива на маркерите за бактериална транслокация при пациенти с позитивен HBeAg.

Пациентите с С вирусна инфекция и НСС имаха значимо по-високи серумни нива на sCD14 в сравнение с останалите болни в групата. Маркерът не отдиференцира пациентите с НСС сред болните с чернодробна цироза. Заедно с него наблюдавахме и значимо по-високи нива на hsCRP. Описана е роля на повишената бактериална транслокация и системна възпалителна активност в канцерогенезата, както и повишената чревна пропускливост и степен на БТ при напреднал чернодробен рак. Описано е забавяне на туморния растеж при терапия за БТ, както и спад в маркерите за БТ при успешно третиране на хепатоцелуларния карцином при пациенти с В вирусна цироза.

## 6 ИЗВОДИ

1. Серумните нива на ЛПЗ не корелират с тежестта и активността на чернодробното заболяване при хронични вирусни хепатити С и В.
2. По-високите серумни нива на sCD14 отдиференцират болните с чернодробна цироза в групата с С вирусна инфекция. Този феномен не е във връзка с тежестта на чернодробната цироза.
3. По-високи серумни нива на sCD14 при С вирусна инфекция съответстват на по-активно чернодробно възпаление и по-изразена системна възпалителна активност.
4. По-високите изходни нива на sCD14 при хроничен вирусен хепатит С съответстват на по-лош терапевтичен отговор към Интерферон-базирани режими.
5. Неактивните носители на В вирусната инфекция имат по-ниски серумни нива на sCD14 от наивните пациенти, които имат показания за специфична противовирусна терапия.

## 7 ПРИНОСИ

1. За първи път в България се оцени връзката между бактериалната транслокация и чернодробното заболяване при хронични вирусни хепатити В и С.
2. Определи се sCD14 като сигнификантен маркер за бактериална транслокация при хронична вирусна С и В инфекция.
3. Установи се връзка на sCD14 с тежестта на заболяването при пациенти с хронична С вирусна инфекция.

## 8 ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- 1) **Lyudmila Kancheva**, Petar Nikolov, Tsvetelina Velikova, Ivan Valkov, Rossen Nikolov, Lyudmila Mateva, 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)
  
- 2) **Л. Кънчева**, П. Николов, Ц. Маринова, А. Алексиев, Д. Попов, А. Иванова, Р. С. Иванова, Д. Желев, К. Антонов, Р. Николов, Л. Матева, sCD14 корелира с активността и тежестта на чернодробното заболяване при пациенти с хроничен хепатит С, Българска хепато-гастроентерология, 2016, кн. 2, 35-39
  
- 3) **Людмила Кънчева**, Патогенетична роля на бактериалната транслокация при хроничен вирусен хепатит В и С, Българска хепато-гастроентерология, 2016, кн. 2, 45-50

## 9 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Боянова Я., Антонов К., Желев Д., Матева Л., Кръстев З.. Общите серумни жлъчни киселини като предиктор на ефекта от противовирусното лечение на хроничната хепатит В и С вирусна инфекция. Българска хепатогастроентерология 2016 (2); 27-30.
2. Вълков И. Хроничен хепатит С – вирусна инфекция асоциирана с липидната обмяна. Българска хепатогастроентерология 2016 (2); 40-45.
3. Кръстев Н., Джурков В., Мурджева М., Акрабова П., Кърпарова Т., Асенов К., Киприн Г., Кузманов В.. Метаморфоза на спонтанния бактериален перитонит. Българска хепатогастроентерология 2013 (2); 35-40.
4. Тодорова Д., Петрова Д.. Честота на захарния диабет от II-ри тип при болни с хронична хепатит С вирусна инфекция. Българска хепатогастроентерология 2012 (2); 45-49
5. Препоръки (консенсус) за диагноза, лечение и проследяване на болни с хроничен хепатит С. Българска хепатогастроентерология 2014 (2); 3-13
6. Aghemo A, Prati GM, Rumi MG, Soffredini R, D'Ambrosio R, Orsi E, et al. Sustained virological response prevents the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2012; 56(5): 1681–7
7. Aly AM, Adel A, El-Gendy AO, Essam TM, Aziz RK. Gut microbiome alterations in patients with stage 4 hepatitis C. *Gut Pathog.* 2016 Sep 13; 8(1): 42
8. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Molecular Medicine* 2011; 3
9. Arab JP, Martin-Mateos RM, Shah VH. Gut-liver axis, cirrhosis and portal hypertension: the chicken and the egg. *Hepatology Int.* 2017 May 26; doi: 10.1007/s12072-017-9798-x.

10. Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, et al. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013; 57(3): 964–73.
11. Ascione T, Di Flumeri G, Boccia G, De Caro F. Infections in patients affected by liver cirrhosis: an update. *Infez Med.* 2017 Jun 1; 25(2): 91-97
12. Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 439–446.
13. Bajaj JS, Ratliff SM, Heuman DM, Lapane KL. Proton pump inhibitors are associated with a high rate of serious infections in veterans with decompensated cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 866–874
14. Bajaj JS, Ridlon JM, Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, et al. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: 168–175
15. Bajaj JS, Zadvornova Y, Heuman DM, Hafeezullah M, Hoffmann RG, Sanyal AJ, et al. Association of proton pump inhibitor therapy with spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1130–1134
16. Bajaj JS. The role of microbiota in hepatic encephalopathy. *Gut Microbes* 2014; 5: 397–403
17. Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *J Viro.* 2008; 82(6): 2606–12
18. Bas S, Benoit R, et al. CD14 Is an Acute-Phase Protein. *J of Immunol.* 2004; 172(7): 4470-4479
19. Bellot P, Francés R, Such J. Bacterial translocation in cirrhosis (in Spanish). *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31: 508–514

20. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011; 18(2): 139–43.
21. Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M, et al. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol* 1995; 25: 604-610
22. Bunchorntavakul C, Chavalitdhamrong D. Bacterial infections other than spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *World J Hepatol* 2012; 4: 158–168.
23. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56(7): 1761-1772.
24. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57(6): 1470-1481.
25. Carotenuto P, van Riel D, Artsen A, Bruijns S, et al. Antiviral Treatment with Alpha Interferon Up-Regulates CD14 on Liver Macrophages and Its Soluble Form in Patients with Chronic Hepatitis B Antimicrobial agents and chemotherapy 2005; 49(2): 590-599
26. Chang IC, Huang SF, Chen PJ, Chen CL, Wu CC, Tsai CC, et al. The hepatitis viral status in patients with hepatocellular carcinoma: a study of 3843 patients from Taiwan liver cancer network. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(15): e3284.
27. Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Gewirtz AT. Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology* 2014; 59: 328–339.
28. Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Chen Y, Lei D, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2011; 54: 562–572.
29. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taurá P, Fuster J, García-Valdecasas JC, Lacy A, Suárez MJ, Rimola A, Rodés J. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 32–37.

30. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic. *Disease Genome Medicine* 2016; 8: 42
31. Coltart I, Tranah TH, Shawcross DL. Inflammation and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 2013; 536: 189-196
32. Culligan EP, Hill C, Sleator RD: Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathog* 2009; 1: 19-45
33. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, Caviglia JM, Khiabani H, Adeyemi A, Bataller R, Lefkowitz JH, Bower M, Friedman R, Sartor RB, Rabadan R, Schwabe RF. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 2012; 21: 504–516
34. de Courten B, Moreno-Navarrete JM, et al. Contrasting association of circulating sCD14 with insulin sensitivity in non-obese and morbidly obese subjects. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60(1): 103-109.
35. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr.* 2007; 10: 142–8
36. Delgado-Borrego A, Jordan SH, Negre B, Healey D, Lin W, Kamegaya Y, et al. Reduction of insulin resistance with effective clearance of hepatitis C infection: results from the HALT-C trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8(5): 458–62.
37. Deltenre P, Louvet A, Lemoine M, Mourad A, Fartoux L, Moreno C, et al. Impact of insulin resistance on sustained response in HCV patients treated with pegylated interferon and ribavirin: a meta-analysis. *J Hepatol* 2011; 55(6): 1187–94.
38. Dhiman RK. Gut microbiota and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2013; 28: 321–326
39. Djuric Z. Obesity-associated cancer risk: the role of intestinal microbiota in the etiology of the host proinflammatory state. *Transl Res.* 2017; 179: 155-167.
40. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of

- TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NFkappa B signaling pathway components. *J Immunol* 2003; 170: 508-519.
41. Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang KM, Vonderheide RH, et al. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology* 2012; 55: 709–719.
  42. Dolganiuc A, Norkina O, et al. Viral and host factors induce macrophage activation and loss of Toll Like Receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology* 2007; 133(5): 1627–1636
  43. Douhara A, Moriya K, Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, Aihara Y, Nishimura N, Takeda K, Okura Y, Kawaratani H, Fukui H. Reduction of endotoxin attenuates liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cell activation and remission of intestinal permeability in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Mol Med Rep* 2015; 11: 1693–1700
  44. Durieux JJ, Vita N, Popescu O, Guette F, Calzada-Wack J, Munker R, Schmidt RE, Lupker J, Ferrara P, Ziegler-Heitbrock HW, et al. 1994. The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 2006; 24.
  45. Dyal HK, Aguilar M, Bartos G, Holt EW, Bhuket T, Liu B, et al. Diabetes mellitus increases risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus patients: a systematic review. *Dig Dis Sci* 2016; 61(2): 636–45.
  46. Elkrief L, Chouinard P, Bendersky N, Hajage D, Larroque B, Babany G, et al. Diabetes mellitus is an independent prognostic factor for major liver-related outcomes in patients with cirrhosis and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2014; 60(3): 823–31.
  47. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(3): 369–80.

48. El-Serag HB, Kanwal F, Richardson P, Kramer J. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2016; 64(1): 130–7.
49. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011; 365: 1118–1127.
50. Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, Canani RB, Calignano A, Raso GM, Meli R. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr* 2009; 139: 905–911.
51. Fabrizio C, Procopio A, Scudeller L, Dell'Acqua R, Bruno G, Milano E, et al. HCV and diabetes: towards a 'sustained' glycaemic improvement after treatment with DAAs. *Clin Microbiol Infect* 2016.
52. Fernández J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, de Lope CR, Roca D, et al. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 2012; 55: 1551–1561.
53. Fernández-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, López-Bermejo A, Ricart W. CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(4): 1780-1784.
54. Fernández-Real JM, Pérez del Pulgar S, Luche E, et al. CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance. *Diabetes.* 2011; 60(8): 2179-2186.
55. Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol* 2012; 56: 1283–1292.
56. Fukui H. Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia. *World J Hepatol* 2015; 7(3): 425-442
57. Gao TT, Qin ZL, Ren H, Zhao P, Qi ZT. Inhibition of IRS-1 by hepatitis C virus infection leads to insulin resistance in a PTENdependent manner. *Virol J* 2015; 12: 12.
58. Garcia-Martinez R, Noiret L, Sen S, Mookerjee R, Jalan R. Albumin infusion improves renal blood flow autoregulation in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute kidney injury. *Liver Int* 2015; 35: 335-343

59. Gastaldi G, Goossens N, Cle´ment S, Negro F. Current level of evidence on causal association between hepatitis C virus and type 2 diabetes: A review. *Journal of Advanced Research* 2017; 8: 149–159
60. Gioannini TL, Teghanemt A, Zarembler KA, Weiss JP. Regulation of interactions of endotoxin with host cells. *J Endotoxin Res.* 2003; 9(6): 401-408
61. Giordanino C, Bugianesi E, Smedile A, Ciancio A, Abate ML, Olivero A, et al. Incidence of type 2 diabetes mellitus and glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C infection by response to treatment: results of a cohort study. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(10): 2481–7
62. Golabi P, Jeffers T, Younoszai Z, Otgonsuren M, Sayiner M, Mishra A, Venkatesan C, Younossi ZM. Independent Predictors of Mortality and Resource Utilization in Viral Hepatitis Related Hepatocellular Carcinoma. *Ann Hepatol* 2017 Aug 1; 16(4): 555-564
63. G3mez-Hurtado I, Such J, Sanz Y, Franc3s R. Gut microbiota-related complications in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15624–15631.
64. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 415–445.
65. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883–899.
66. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(5): 367–77.
67. Guo J, Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair* 2010; 3: 21
68. Guo X, Jin M, Yang M, Liu K, Li JW. Type 2 diabetes mellitus and the risk of hepatitis C virus infection: a systematic review. *Sci Rep* 2013; 3: 2981
69. Gutschmann T, Muller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and

- enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun.* 2001; 69(11): 6942-6950
70. Halmos T, Suba I. Physiological patterns of intestinal microbiota. The role of dysbacteriosis in obesity, insulin resistance, diabetes and metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2016; 157(1): 13-22.
71. Hammerstad SS, Grock SF, Lee HJ, Hasham A, Sundaram N, Tomer Y. Diabetes and hepatitis C: a two-way association. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6: 134.
72. Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8(6): 961-965
73. Haziot A, Rong GW, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993; 151: 1500-1507
74. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 2002; 323(1-2): 59-72.
75. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336: 1268–1273
76. Hsu D, Fukata M, Hernandez YG, Sotolongo JP, Goo T, Maki J, Hayes LA, Ungaro RC, Chen A, Breglio KJ, et al. Toll-like receptor 4 differentially regulates epidermal growth factor-related growth factors in response to intestinal mucosal injury. *Lab Invest.* 2010; 90: 1295–1305.
77. Hsu YC, Lin JT, Ho HJ, Kao YH, Huang YT, Hsiao NW, et al. Antiviral treatment for hepatitis C virus infection is associated with improved renal and cardiovascular outcomes in diabetic patients. *Hepatology* 2014; 59(4): 1293–302.
78. Huang CF, Yeh ML, Huang CY, Tsai PC, Ko YM, Chen KY, et al. Pretreatment glucose status determines HCC development in HCV patients with mild liver disease after curative antiviral therapy. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(27): e4157

79. Huang LT, Hung JF, Chen CC, Hsieh CS, Yu HR, Hsu CN, Tain YL. Endotoxemia exacerbates kidney injury and increases asymmetric dimethylarginine in young bile duct-ligated rats. *Shock* 2012; 37: 441-448
80. Huang YW, Yang SS, Fu SC, Wang TC, Hsu CK, Chen DS, et al. Increased risk of cirrhosis and its decompensation in chronic hepatitis C patients with new-onset diabetes: a nationwide cohort study. *Hepatology* 2014; 60(3): 807–14.
81. Ilan Y. Leaky gut and the liver: a role for bacterial trans location in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastro-enterol* 2012; 18: 2609–2618.
82. Imani Fooladi AA, Mahmoodzadeh Hosseini H, Nourani MR, Khan i S, Alavian SM. Probiotic as a novel treatment strategy against liver disease. *Hepat Mon* 2013; 13: e7521.
83. Immune Dysfunction in Cirrhosis Mohd Talha Noor and Piyush Manoria *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2017 vol. 5 | 50–58
84. Isayama F, Hines IN, Kremer M, Milton RJ, Byrd CL, Perry AW, et al. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290(6): 1318-1328.
85. Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, Piccigallo E, Amati L, Lembo A, Kalis C, Gumenscheimer M. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 319-327.
86. Jirillo E, Amati L, Caradonna L, et al. Soluble (s) CD14 and plasmatic lipopolysaccharides (LPS) in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon(IFN)-alpha, *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1998; 20(1): 1-14
87. Jun DW, Kim KT, Lee OY, Chae JD, Son BK, Kim SH, et al. Association between small intestinal bacterial overgrowth and peripheral bacterial DNA in cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1465–1471.
88. Kalaitzakis E, Johansson JE, Bjarnason I, Bjornsson E. Intestinal permeability in cirrhotic patients with and without ascites. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 326–330.

89. Kalambokis GN, Mouzaki A, Rodi M, Pappas K, Fotopoulos A, Xourgia X, Tsianos EV. Rifaximin improves systemic hemodynamics and renal function in patients with alcohol-related cirrhosis and ascites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 815-818
90. Karagiannakis DS, Vlachogiannakos J, Anastasiadis G, VafiadisZouboulis I, Ladas SD. Frequency and severity of cirrhotic cardiomyopathy and its possible relationship with bacterial endotoxemia. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 3029-3036
91. Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 485-493
92. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res.* 2005; 11(4): 225-229.
93. Koutsounas I, G. Kaltsa, et al. Markers of bacterial translocation in end-stage liver disease. *World J Hepatol.* 2015; 7(20): 2264-2273.
94. Krag A, Bendtsen F, Henriksen JH, Møller S. Low cardiac output predicts development of hepatorenal syndrome and survival in patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2010; 59: 105-110
95. Lachar J, Bajaj JS. Changes in the Microbiome in Cirrhosis and Relationship to Complications: Hepatic Encephalopathy, Spontaneous Bacterial Peritonitis, and Sepsis. *Semin Liver Dis.* 2016 Sep; 36(4): 327-330.
96. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nature Reviews Endocrinology* 2016; 12(1): 15e28.
97. Lata J. Hepatorenal syndrome. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4978-4984
98. Li DY, Yang M, Edwards S, Ye SQ: Nonalcoholic fatty liver disease: for better or worse, blame the gut microbiota. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013; 37: 787–793.
99. Li N, Zhu Q, Yang C, Li F, Zhou Z, et al. Elevated serum soluble CD14 levels in chronic HBV infection are significantly associated with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2016; 37(5): 6607-6617.

100. Liang H, Hussey SE, Sanchez-Avila A, Tantiwong P, Musi N. Effect of lipopolysaccharide on inflammation and insulin action in human muscle. *PLoS One* 2013; 8(5): e63983
101. Lin CY, Tsai IF, Ho YP, Huang CT, Lin YC, Lin CJ, et al. Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2007; 46: 816–826.
102. Lin YJ, Shaw TG, Yang HI, Lu SN, Jen CL, Wang LY, et al. Chronic hepatitis C virus infection and the risk for diabetes: a community-based prospective study. *Liver Int* 2016
103. Madsen BS, Havelund T, Krag A: Targeting the gut-liver axis in cirrhosis: antibiotics and non-selective  $\beta$ -blockers. *Adv Ther* 2013; 30: 659–670.
104. Malaguarnera G, Giordano M, Nunnari G, Bertino G, Malaguarnera M. Gut microbiota in alcoholic liver disease: Pathogenetic role and therapeutic perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(44): 16639-16648.
105. Mandair DS, Rossi RE, Pericleous M, Whyand T, Caplin M. The impact of diet and nutrition in the prevention and progression of hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 8: 369–382.
106. Marchetti, et al. Immune activation and microbial translocation in liver disease progression in HIV/hepatitis co-infected patients: results from the Icona Foundation study. *BMC Infect Dis*. 2014; 14(79): 1471-2334.
107. Márquez M, Fernández-Gutiérrez C, Montes-de-Oca M, Blanco MJ, Brun F, Rodríguez-Ramos C, et al. Chronic antigenic stimuli as a possible explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2009; 158: 219–229.
108. Medhat E, et al. Serum Soluble CD14 in Egyptian Patients with Chronic Hepatitis C: Its Relationship to Disease Progression and Response to Treatment. *J Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(7): 563-568.

109. Meuleman P, Steyaert S, et al. Human hepatocytes secrete soluble CD14, a process not directly influenced by HBV and HCV infection. *Clinica Chimica Acta*. 2006; 366(1-2): 156-162
110. Michelena J, Altamirano J, Abrales JG., Affò S, MoralesIbanez O, et al. Systemic Inflammatory Response and Serum Lipopolysaccharide Levels Predict Multiple Organ Failure and Death in Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*. 2015; 62(3): 762-772
111. Milner KL, van der Poorten D, Trenell M, Jenkins AB, Xu A, Smythe G, et al. Chronic hepatitis C is associated with peripheral rather than hepatic insulin resistance. *Gastroenterology* 2010; 138(3): 932–41, e1–3.
112. Mitsuyoshi H, Itoh Y, Sumida Y, Minami M, Yasui K, Nakashima T, et al. Evidence of oxidative stress as a cofactor in the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepato Res* 2008; 38(4): 348–53.]
113. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serino M, Luche E, Waget A, Pardo G, et al. Circulating lipopolysaccharide- binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2012; 36(11): 1442-1449.
114. Morris MC, Gilliam EA, Li L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front Immunol*. 2015; 5: 680.
115. Munteanu D, Negru A, Radulescu M, Mihailescu R, Arama SS, Arama V. Evaluation of bacterial translocation in patients with chronic HCV infection. *Rom J Intern Med* 2014; 52: 91–96
116. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med*. 2011; 62: 361–380
117. Nannini P, Sokal EM. Hepatitis B: changing epidemiology and interventions. *Arch Dis Child*. 2017 Jul; 102(7): 0. doi: 10.1136/archdischild-2016-312043. Epub 2016 Dec 16.

118. Nazli A, Yang PC, Jury J, Howe K, Watson JL, Soderholm JD, et al. Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat. *Am J Pathol.* 2004; 164: 947–57
119. Neves AL, Chilloux J, Sarafian MH, Rahim MB, Boulange CL, Dumas ME. The microbiome and its pharmacological targets: therapeutic avenues in cardiometabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2015; 25: 36–44.
120. Nien HC, Hsu SJ, Su TH, Yang PJ, Sheu JC, Wang JT, et al. High Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein Level in Chronic Hepatitis C Viral Infection Is Reduced by Anti-Viral Treatments. *PLoS One.* 2017 Jan 20; 12(1): e0170028.
121. Noor MT, Tiwari M, Kumar R. Non-HFE iron overload as a surrogate marker of disease severity in patients of liver cirrhosis. *Indian J Gastroenterol* 2016; 35: 33–39.
122. Norman K, Pirlich M, Schulzke JD, Smoliner C, Lochs H, Valentini L, et al. Increased intestinal permeability in malnourished patients with liver cirrhosis. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66: 1116–1119.
123. Nyström J, Stenkvist J et al. Low Levels of Microbial Translocation Marker LBP Are Associated with Sustained Viral Response after Anti-HCV Treatment in HIV-1/HCV Co-Infected Patients, *PLoS ONE.* 2015; 10(3): 55.
124. Ohtani N. Microbiome and cancer. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 65–72.
125. Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 454–459.
126. Pahwa R, Devaraj S, Jialal I. The effect of the accessory proteins, soluble CD14 and lipopolysaccharide-binding protein on Toll-like receptor 4 activity in human monocytes and adipocytes. *Int J Obes (Lond).* 2016; 40(6): 907-911
127. Pande C, Kumar A, Sarin SK. Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 1273–1281.

128. Pavone P, Tieghi T, d'Ettorre G, Lichtner M, Marocco R, Mezzaroma I, et al. Rapid decline of fasting glucose in HCV diabetic patients treated with direct-acting antiviral agents. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(5): 462 e1–3.
129. Chen P, Schnabl B. Host-Microbiome Interactions in Alcoholic Liver Disease. *Gut and Liver*. 2014; 8(3): 237-241.
130. Petta S, Camma C, Di Marco V, Macaluso FS, Maida M, Pizzolanti G, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with severe fibrosis in patients with chronic hepatitis caused by HBV or HCV infection. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011; 31(4): 507-515.
131. Pijls KE, Jonkers DM, Elamin EE, Masclee AA, Koek GH: Intestinal epithelial barrier function in liver cirrhosis: an extensive review of the literature. *Liver Int* 2013; 33: 1457–1469.
132. Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R Jr, Dinis-Ribeiro M, Leite-Moreira AF. Role of Toll-like receptor impairment in cirrhosis infection risk: are we making progress? *Liver Int* 2011; 31: 140–141
133. Piñero P, Juanola O, Caparrós E, Zapater P, Giménez P, González-Navajas JM, Such J, Francés R. Toll-like receptor polymorphisms compromise the inflammatory response against bacterial antigen translocation in cirrhosis. *Sci Rep*. 2017 Apr 18; 7: 46425.
134. Piotrowski D, Boroń-Kaczmarek A. Bacterial infections and hepatic encephalopathy in liver cirrhosis-prophylaxis and treatment. *Adv Med Sci*. 2017 May 14; 62(2): 345-356
135. Ray K. Gut microbiota: obesity-induced microbial metabolite promotes HCC. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 442.
136. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, Mandorfer M, Heinisch BB, Hayden H, et al. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013; 58: 911–921.

137. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2014 vol. 60 j 197–209
138. Richard L, et al. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res.* 2005; 11(4): 225-229.
139. Roderburg C, Luedde T. The role of the gut microbiome in the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes* 2014; 5: 441–445
140. Romero-Gomez M, Fernandez-Rodriguez CM, Andrade RJ, Diago M, Alonso S, Planas R, et al. Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; 48(5): 721–7.
141. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 16767–72.
142. Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, Kleiner DE, Deeks SG, Liang TJ, Heller T, Douek DC. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology* 2011; 141(4): 1220-1230
143. Scheithauer TP, Dallinga-Thie GM, de Vos WM, Nieuwdorp M, van Raalte DH. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Mol Metab.* 2016; 5(9): 759-770.
144. Schnabl B, Brandl K, Fink M, et al. A TLR4/MD2 fusion protein inhibits LPS-induced proinflammatory signaling in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 375: 210–214
145. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008; 371: 838–851.
146. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 800–812.

147. Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18(1): 190-195.
148. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007; 13: 1324-1332
149. Senzolo M, Cholongitas E, Burra P, Leandro G, Thalheimer U, Patch D, et al. beta-Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Liver Int* 2009; 29: 1189–1193.
150. Senzolo M, Cholongitas E, Burra P, Leandro G, Thalheimer U, Patch D, et al. Beta-Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Liver Int* 2009; 29: 1189–1193.
151. Sharma V, Garg S, Aggarwal S: Probiotics and liver disease. *Perm J* 2013; 17: 62–67.
152. Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2564–2577
153. Smith-Palmer J, Cerri K, Valentine W. Achieving sustained virologic response in hepatitis C: a systematic review of the clinical, economic and quality of life benefits. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 19.
154. Sozinov AS. Systemic endotoxemia during chronic viral hepatitis. *Bull Exp Biol Med.* 2002; 133(2): 153-155
155. Stepanova M, Rafiq N, Younossi ZM. Components of metabolic syndrome are independent predictors of mortality in patients with chronic liver disease: a population-based study. *Gut* 2010; 59(10): 1410–5.
156. Steyaert S, Vanlandschoot P, et al. Soluble CD14 Levels Are Increased and Inversely Correlated With the Levels of Hepatitis B Surface Antigen in Chronic Hepatitis B Patients. *J Med Virol.* 2003; 71(2): 188-194.
157. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283: 256-265.

158. Szabo G, Dolganiuc A, Mandrekar P. Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases. *Hepatology* 2006; 44: 287–298.
159. Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2008; 28: 26–42.
160. Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signalling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012; 3: 181.
161. Terg R, Casciato P, Garbe C, Cartier M, Stieben TE, Mendizabal M, et al. Proton pump inhibitor therapy does not increase the incidence of bacterial infection in decompensated cirrhotic patients. A nationwide multicenter, prospective study. *Hepatology* 2013; 56: 255A.
162. Testro AG, Gow PJ, Angus PW, Wongseelashote S, Skinner N, Markovska V, et al. Effects of antibiotics on expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 on mononuclear cells in patients with advanced cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 52: 199–205.
163. Theocharidou E, Dhar A, Patch D. Gastrointestinal Motility Disorders and Their Clinical Implications in Cirrhosis. *Gastroenterol Res Pract.* 2017; 2017(8): 270-310.
164. Thompson AJ, Locarnini SA, Lau GK, Naoumov NV, Desmond PV, MommejaMarin H, et al. Quantitative HBeAg levels and patterns of TLR2 and TLR4 expression on CD14+ monocytes during potent antiviral therapy for chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: A83.
165. Thrift AP, El-Serag HB, Kanwal F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Feb; 14(2): 122-132.
166. Toffanin S, Cornella H, Harrington A, Llovet JM. HCC is promoted by bacterial translocation and TLR-4 signaling: a new paradigm for chemoprevention and management. *Hepatology* 2012; 56: 1998–2000

167. Torsten P.M. Scheithauer, Geesje M. Dallinga-Thie, Willem M. de Vos, Max Nieuwdorp, Daniël H. van Raalte Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance *MOLECULAR METABOLISM* 5 (2016) 759e770
168. Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Frances R, Shah N, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* 2011; 55: 574–581.
169. van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H, Dufour JF, Lammert F, et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA* 2012; 308(24): 2584–93.
170. Vanni E, Abate ML, Gentilcore E, Hickman I, Gambino R, Cassader M, et al. Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009; 50(3): 697–706.
171. Vanni E, Bugianesi E, Saracco G. Treatment of type 2 diabetes mellitus by viral eradication in chronic hepatitis C: Myth or reality? *Dig Liver Dis* 2016; 48(2): 105–11. 15
172. Vespasiani-Gentilucci U, Carotti S, Perrone G, Mazzarelli C, Galati G, Onetti-Muda A, et al. Hepatic toll-like receptor 4 expression is associated with portal inflammation and fibrosis in patients with NAFLD. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015; 35(2): 569-581.
173. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012; 143(4), 913.e7e916.e7.
174. Waidmann O, Brunner F, Herrmann E, Zeuzem S, Piiper A, Kronenberger B. Macrophage activation is a prognostic parameter for variceal bleeding and overall survival in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2013; 58: 956–961.

175. Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, Timmer-Stranghöner A, Vidacek D, Siewert E, et al. Patients with acute on chronic liver failure display “sepsis-like” immune paralysis. *J Hepatol* 2005; 42: 195–201.
176. Wiest R, Lawson M, Geuking M. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *J Hepatol* 2014; 60: 197–209
177. Wurfel MM, Hailman E, Wright SD. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med* 1995; 181(5): 1743-1754.
178. Yu LX, Yan HX, Liu Q, Yang W, Wu HP, Dong W, Tang L, Lin Y, He YQ, Zou SS, Wang C, Zhang HL, Cao GW, Wu MC, Wang HY: Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents. *Hepatology* 2010; 52: 1322–1333.
179. Zare-Bidaki M, Tsukiyama-Kohara K, Arababadi MK. Toll-like receptor 4 and hepatitis B infection: molecular mechanisms and pathogenesis. *Viral Immunol* 2014; 27: 321–326
180. Zhang HL, Yu LX, Yang W, Tang L, Lin Y, Wu H, Zhai B, Tan Y X, Shan L, Liu Q, Chen HY, Dai RY, Qiu BJ, He YQ, Wang C, Zheng LY, Li YQ, Wu FQ, Li Z, Yan HX, Wang HY: Profound impact of gut homeostasis on chemically induced pro-tumorigenic inflammation and hepatocarcinogenesis in rats. *J Hepatol* 2012; 57: 803–812.
181. Zhang J, Feng G, Zhao Y, Zhang J, Feng L, Yang J. Association between lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) and the mortality of HBV-related liver cirrhosis: a retrospective cohort study. *BMJ Open* 2015; 5:e008033.
182. Zuckerman MJ, Menzies IS, Ho H, Gregory GG, Casner NA, Crane RS, et al. Assessment of intestinal permeability and absorption in cirrhotic patients with ascites using combined sugar probes. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 621–626