МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ
УМБАЛ “СВЕТИ ИВАН РИЛСКИ“ЕАД

Еволюция на напредналата чернодробна болест след успешна ерадикация на хронична HCV инфекция с директно действащи антивирусни средства

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

д-р Христо Пенчев Пенчев

Научна специалност - Гастроентерология

Научен ръководител:
ПРОФ. КРАСИМИР АНТОНОВ АНТОНОВ, дмн
Катедра по вътрешни болести, МФ, МУ-София
КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ
УМБАЛ„СВЕТИ ИВАН РИЛСКИ” ЕАД, ГР. СОФИЯ

София, 2023 г.

Дисертационният труд е представен на 115 стандартни печатни страници, онагледен с 25 фигури и 12 таблици. В библиографията са включени 192 заглавия. Във връзка с дисертационния труд са реализирани 11 публикации, от които едната в списание с импакт фактор и 5 участие в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по вътрешно болести, МУ - София (27.03.2023г.) и е насочен за защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Росен Кирилов Николов, дм – вътрешен член

Проф. д-р Деян Тонев Желев, дмн – вътрешен член

Проф. д-р Захари Александров Кръстев, дмн – външен член

Проф. д-р Крум Сотиров Кацаров, дмн – външен член

Доц. д-р Радин Цонев Цонев, дм – външен член

Резервни членове:

Проф. д-р Зоя Ангелова Спасова, дм – вътрешен член

Проф. д-р Владимир Николов Андонов, дм – външен член

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на

Катедра по вътрешни болести

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на

04.09.2023 г. от 12.00 ч. в аулата на УМБАЛ „ Св. Иван Рилски” ЕАД

Съдържание

Използвани съкращения: 4
на кирилица: 4
на латиница: 4
1. Въведение 6
2. Цели и задачи 7
2.1. Цели: 7
2.2. Задачи: 8
3. Материали и методи 10
4. Резултати 21
5. Дискусия 53
6. Изводи 57
7. Приноси 59

Използвани съкращения:

на кирилица:

АЛАТ – аланин аминотрансфераза

АСАТ – аспартат аминотрансфераза

α2МГ – алфа-2 макроглобулин

ГГТ – гама-глутамилтранспептидаза

ДДАС – директно действащи антивирусни средства

ЕВЛ – ендоскопско връзково лигиране

ЕП - енцефалопатия

ПХ – портална хипертония

ПЧР – първичен чернодробен рак

ТВО – траен вирусологичен отговор

ХБЗ – хронична бъбречно заболяване

ХЗСН – хронична застойна сърдечна недостатъчност

ХК – хиалуронова киселина

ЧБ – чернодробна биопсия

ЧТ – чернодробна трансплантация

на латиница:

AAR – AST/ALT ratio

CTPS – Child-Turcotte-Pugh Score

ECM -екстрацелуларен матрикс

FIB-4 – fibrosis-4

GAPRI (GPR) - gamma-glutamyl transpeptidase to platelet count

HBV – вирусен хепатит В

HCV – вирусен хепатит С

HCC – хепатоцелуларен карцином

HRS – хепаторенален синдром

MELD – model for end-stage liver disease

METAVIR – Meta-Analysis of Histologic DATA in Viral Hepatitis

MMP – матриксни металопротеинази

NPV – negative predictive value

PPV – positive predictive value

PIIINP - амино-терминален пропептид от тип III колаген

HVPG – градиент на чернодробно венозно налягане

TIMP – тъканни инхибитори на металопротеиназите

UA- пикочна киселина

1. Въведение

След навлизането на ДДАС лечението на хроничната HCV инфекция стана лесно, с голяма успеваемост (>95%) и с добра поносимост от страна на пациентите. Многообразие от неинвазивни методи за оценка на степента на чернодробното увреждане заместиха хистологичното изследване на черния дроб преди лечението. Проследяването на възвратимостта на чернодробните промени след постигането на ТВО чрез хистологично изследване отдавна се отхвърли като неподходящо. Това налага изработването на комплекси от неинвазивни методи за изследване, които да дадат информация за протичащите оздравителни процеси в черния дроб или липсата на такива. Това е особенно важно в случаите на чернодробна цироза (компенсирана или декомпенсирана), където е необходимо да се знае в каква степен успешната ерадикация на HCV е съпроводена и с обратно развитие на чернодробната фиброза. Тези неинвазвини методи за оценка на реверзибилността на фиброзата трябва да отговарят на изискванията за безопасност, чувствителност, специфичност, репродуктивност и ниска себестойност.

2. Цели и задачи

2.1. Цел:

Да се оценят промените в активността и степента на чернодробното увреждане при пациенти с хронична HCV инфекция, постигнали ТВО в резултат на лечение с ДДАС и проследени поне 6 месеца след това, при използване на широк спектър от клинични, клинико-лабораторни, имунологични и инструментални методи за изследване.

2.2. Задачи:

2.2.1. Да се оценят активността и степента на чернодробното увреждане при пациенти с хронична HCV инфекция преди лечение с ДДАС с помощта на хистологични, клинико-лабораторни, имунологични и инструментални методи за изследване.

2.2.2. Да се изследват и сравнят стойностите на TIMP-1, A2МГ и HA при пациентите с хроничен хепатит, чернодробна цироза (Чайлд А) и декомпенсирана чернодробна цироза (Чайлд В и С) преди лечение с ДДАС.

2.2.3. Да се сравни чувствителността и специфичността на различни неинвазивни методи за изследвания на степента на чернодробното увреждане, с хистологичните находки преди началото на лечението с ДДАС и да се проследи тяхната промяна при пациентите, постигнали ТВО.

2.2.4. Да се проследят и сравнят промените в стойностите на TIMP-1, A2МГ и ХК при пациентите с хроничен хепатит, чернодробна цироза (Чайлд А) и декомпенсирана чернодробна цироза (Чайлд В и С) след постигане на ТВО.

2.2.5. Да се създаде панел от изследвания, позволяващ отчитане на обратно развитие на чернодробното възпаление и фиброза.

2.2.6. Създаване на скорова система за оценка на риска от смърт в резултат на чернодробното увреждане при пациенти с хронична HCV инфекция след постигане на ТВО.

2.2.7. Оценка на качеството на живот и промяната му преди и след успешна ерадикация на хронична HCV инфекция и изследване на връзката му с промените в активността на чернодробната болест и в степента на чернодробно увреждане.

2.2.8.Да разработим модел за прогнозиране на вероятността за настъпване на летален изход при пациент на база на изходни изследвания.

3. Материали и методи

В клиника по гастроентерология УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД за периода 01.2014 –край август 2021 г. при 935 човека, с диагностициран хроничен вирусен хепатит С, с активна вирусна репликация, е назначено лечение с ДДАС. Терапията е успешно приключила при 839 човека, без да се наблюдават сериозни НЛР. ТВО е регистриран при 774 (92%). В хода на терапията са починали 3 пациенти, а след приключване на лечението, преди да постигнат ТВО още 5, с декомпенсирана чернодробна цироза са починали - 2 . От пангенотипните режими Глекапреви/Пибрентасвир е назначен при 170 човека, като 37 са загубени от проследяване, от останалите 133 пациента не са отговорили 3 (2,3 %), а ТВО е постигнат при 130 пациента (97,3%). Със Софосбувир/Велпатасвир се започна лечение 76 пациента, като 15 не са се явили за проследяване, 93% (n= 61) са постигнали ТВО, а 7% (n=5) - не са постигнали. Софосбувир/Велпатасвир/Воксилапревир беше назначен при 4 пациенти, неотговорили пациенти, без история за декомпенсирано чернодробно заболяване, които не са отговорили на другите пангенотипни режими, като всички те са постигнали ТВО 12 или 24 седмици след приключване на терапията.

Половото разпределение на пациентите с ТВО беше: мъже 51% (n=395), жени -49 % (n=379).

От постигналите ТВО - болни, генотипизирани бяха 558 болни. Окончателна диагноза и съответно разпределение в диагностична група можеше да се проведе при 503 болни както следва: хроничен хепатит - 318, с компенсирана чернодробна цироза – 124, с данни за декомпенсирана чернодробна цироза - 61.

Снемане на анамнеза и статус в Клиника по гастроентерология УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД.

Лабораторни изследвания (хематологични параметри, биохимични показатели за оценка на чернодробното заболяване, електролитния баланс, възпалителни маркери, коагулационен статус и допълнителни при съответните показания) изработени в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД

Образни изследвания – при всички пациенти бяха проведени ехография на коремни органи, оценка на кръвотока в системата на vena portae чрез методът на Doppler, електрокардиограма.

За ехографско изследване на коремни органи в B-mode, Color-Doppler, Power-Doppler, за изследване на кръвотока в системата на v. portae, контраст- усилена ехография и Strain еластография (Hitachi Real-time Tissue еластография) се използваше Hitachi Arietta V60. При проследяване беше проведена Strain еластография на 50 човека, постигнали ТВО.

При съмнение за неопластичен процес, тромбоза в порталната система и др. бяха проведени и допълнителни образни изследвания (КТ, МРТ) в Отделение по образна диагностика УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, както и КУЕ и хистологична верификация.

ТЕ беше проведена на Fibroscan Compact (Echosens) 530 F81376 софтуер 4.0.3 P1. Изследването беше проведено на гладно (поне след 6 часа без прием на храна и напитки), в дясно интеркостално пространство на нивото на десния чернодробен лоб, в дорзална позиция на пациента. Десет валидни измервания (определени от софтуера) бяха извършвани на всеки пациент, като се приемаше изследване само с ≥70% успешни измервания, при интерквартилен обхват (IQR)≤30%. Резултатите за плътността са изразени в kPa. Не бяха включени резултатите от пациенти с доказана сърдечна недостатъчност, трикуспидална регургитация, както и при данни

за интра- или екстрахепатална холестазата (от образни изследвания, алкална фосфатаза >150 I/U). При проследяване беше проведена ТЕ на 46 човека.

Strain еластографията беше извършена на гладно след 10 мин. покой на пациента. Средно 3 валидни измервания бяха направени в 8-му межуребрие вдясно с отведена нагоре дясна ръка при задържано дишане. Трансдюсерът беше насочен в посока към сърцето (за да може strain-образът да се генерира от натиска на сърдечните контракции върху черния дроб). Беше избран регион на интерес (ROI) поне на 1 см под чернодробната капсула и бяха избегнати зони с големи съдове. При всяко валидно изследване автоматично от апарата беше изчислен LF индекс (на базата на регистрирани правилно поне 5 сърдечни контракции) по формула, използваща регресионен анализ. От валидните измервания беше приета средната стойност на LF индекс за съответния пациент /виж. Приложение/.

При 385 пациента след получаване на писмено информирано съгласие беше проведена перкутанна чернодробна биопсия по Менгини с игла 18 G преди започване на лечението. Бяха включени резултатите от хистологични изследвания, съдържащи поне 4 портални пространства. Пробите се оцветяваха с Хематоксилин и Еозин и бяха стадирани по METAVIR. Това бяха пациенти без данни за усложнения следствие на портална хипертония, без абсолютни контраиндикации за провеждане на инвазивни изследвания, като манипулацията беше необходима поради актуалните за съответния период изисквания за провеждане на лечение по НЗОК.

Последващо провеждане на чернодробна биопсия не беше проведено при нито един пациент, постигнал ТВО, тъй като това представлява ненужна инвазивна процедура и подходът е отхвърлен от официалните световни и европейски препоръки. Бяха използвани два инструментални метода за неинвазивно интерпретиране на стадий на фиброза чрез определяне на чернодробна плътност – ТЕ (n=46) и Strain еластография (n=50). Cut-off

стойностите, които използвахме за ТЕ по препоръките на производителя бяха: F0-F1 (1-7 kPa); F2 (7-9,5 kPa); F3 (9,5-12,5 kPa); F4(>12,5 kPa).

Неинвазивна оценка на чернодробната фиброза с рутинни лабораторни показатели се осъществи чрез APRI и FIB-4, които бяха съпоставени с GAPRI на изходно ниво и при проследяване.

Таб. 1 Най- разпространените скорове от биологични маркери за оценка на фиброза на черния дроб.

Скор	Формула	Интерпретция
APRI	$APRI = \frac{\frac{АСАТ}{ГГС\ на\ АСАТ}}{Тромбоцити\left(10^{9}/_{L}\right)} \times 100$	• APRI≤0.5 - малко вероятна е напреднала болест • 1≤APRI>0.5 – не може да се изключи значима фиброза; цироза е малко вероятна • 2≤APRI>1 – значима фиброза; не може да се определи цироза • APRI>2 – вероятна цироза
FIB-4	$FIB-4 = \frac{възраст\ x\ АСАТ}{Тромбоцити(10^{9}/L) \times \sqrt{АЛАТ}}$	• FIB-4<1.45 – Цироза малко вероятна • 1.45≥FIB-4≤3.25 – неопределен • FIB-4>3.25 – цироза е вероятна
GAPRI (GPS)	$GAPRI = \frac{ГГТ}{Тромбоцити\left(10^{9}/_{L}\right)} \times 100$	• F≥2 – 0.49 • F≥3 – 0.62 • F=4 = 0,74

Пациентите бяха разделени в две групи:

1. Здрави доброволци /n=23/: при които бяха изключени остри или хронични чернодробни заболявания, актуална или преживяна инфекция с вирусен хепатит, хронични или остри възпалителни заболявания, злокачествени новообразувания, психични заболявания, автоимунни болести или друго здравно състояние, протичащо с активиране на имунна реакция. Включените индивиди в групата нямаха вредни навици – не употребяват системно алкохол (повече от 20 гр./дн. за жени и повече от 40 гр./дн. за мъже), нямаха зависимост към наркотични вещества, не приемаха системно хепатотоксични медикаменти или билки.

2. Пациенти с хроничен вирусен хепатит С /определен с двукратно установена активна вирусна репликация за период от поне 6 месеца/, които бяха излекувани с ДДАС /постигнат ТВО 12 седмици или 24 седмици след края на терапията/.

Пациентите с хроничен вирусен хепатит С бяха допълнително разделени според напредналостта на чернодробната болест :

2.1. С различен стадий на фиброза, но без данни за чернодробна цироза (критериите за поставяне на диагнозата са посочени при втората група)

2.2. Чернодробна цироза- в тази група разпределихме пациентите спрямо поне един от следните критерии:

- данни за F4 (по METAVIR),
- пациенти с данни за варици на хранопровода или стомаха, портална гастропатия, при дифузен паренхимен процес на черния дроб /без данни за прехепатална или постхепатална причина за портална хипертония/

- данни за хиперспленен синдром (моно-, би- или панцитопения, определени от референтните стойности за пола и възрастта на пациента, в комбинация с ехографски установени по- големи размери на слезката спрямо ръстта на пациента), при пациенти с дифузен паренхимен процес на черния дроб
- данни за циротично преустройство на черния дроб и белези за портална хипертония

3. декомпенсирана чернодробна цироза – пациенти с данни към момента или в миналото за асцит, енцефалопатия, иктер или кръвоизлив от горен ГИТ при напреднало чернодробно заболяване

При пациентите с чернодробна цироза /вкл. и декомпенсирана/, които нямаха абсолютни противопоказания за инвазивни манипулации беше проведена фиброгастродуоденоскопия за оценка на варици на хранопровода и стомаха или портална гастропатия.

Анализът на нивата на *HCV RNA* беше извършен чрез количествена real time полимеразна верижна реакция (PCR- polymerase chain reaction) в „Лаборатория по порфирии и молекулярна диагностика на чернодробни заболявания“ УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. За целта беше използвана Rotor-Gene Q System (Quiagen, Germany). Наличието и количественото определяне на HCV РНК беше осъществено чрез кит QIA symphony DSP Virus/Pathogen Midi (Qiagen) и Artus HCV Q5-RGQ Kit (Qiagen), като бяха стриктно спазени инструкциите на производителя. В допълнение беше използван и кит Artus HCV Q5-RGQ с оглед изключването на PCR инхибиция. По този начин се установяваше и вътрешен контрол (IC) във флуоресцентен канал Cycling Orange of the Rotor-Gene Q. Резултатите са получени в международни единици за милилитър (IU/ml). Тестът отчита количествено HCV РНК в интервалът 65 – 1x105 HCV IU/ml. При установяване на HCV RNA при даден пациент, беше провеждано генотипизиране чрез Versant HCV

Genotype Assay (LiPA) 2.0 (Siemens Healthcare Diagnostics). Генотиповете и субгенотиповете, които можеха да се отчетат с метода включваха 1, 1a, 2, 2a/c, 2b, 3, 3a, 3b, 3c, 4, 4a, 4b, 4c/d, 4e, 4f, 4h, 5a и 6a.

Количественото определяне на α-2 MG, HA, TIMP-1 се извърши в „Лаборатория по клинична имунология“ и в „Клинична лаборатория“ на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД. За по-голяма прегледност представихме общият принцип, върху който се основават използваните имуноензимни методи за количествено определяне на α-2 MG, HA, TIMP-1. Методът представлява твърдо-фазова „сандвич” ELISA за *in vitro* количествено определяне на цитокини в биологични материали.

Гнездата на съответната микротитърна плака са натоварени с високоспецифични антитела срещу търсения цитокин. По време на първия инкубационен период се извършва свързване на цитокина, ако присъства в биологичния материал, към фиксираните върху гнездата на плаката антитела. През първия инкубационен етап или на следващ етап, в зависимост от спецификата на кита, се добавя второ биотинилирано анти-антитяло. Излишъкът от биологичния материал и второто антитяло се измиват. Следва инкубация с античовешко антитяло, белязано с конюгат (horse-radish peroxidase (HRP)-стрептавидин) и отново измиване на гнездата на плаката. Ензимната реакция се осъществява посредством добавяне на тетраметилбензидин (TMB)-субстрат с образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е правопропорционален на количеството цитокин в биологичната проба. Построява се стандартна крива според калибраторите на всеки кит и по нея се определя количеството на цитокин в тестваните проби.

Изключващи критерии за провеждане на изследване на TIMP-1; HA; α2МГ:

1. Активна инфекция с HBV или друг хепатотропен вирус
2. Хронично бъбречно заболяване, остра бъбречна увреда, хронична застойна сърдечна недостатъчност, пулмонална хипертония декомпенсиран захарен диабет, късен дегенеративен синдром
3. Психични заболявания
4. Възпалителни заболявания (инфекциозни, автоимунни)
5. Липса на информирано съгласие
6. Непостигнат ТВО

Рутинните кръвни показатели проследихме отново само в тази група, с цел изключване на повлияване в тях от придружаващи заболявания (нефритен, нефротичен синдром, хипертиреоидизъм, хемолитична анемия и др.) и приемани медикаменти (аценокумарол, билки и др.).

Скорови системи, в които включихме стойностите на изследваните молекули :

Hepascore се изчисляваше по следната формула:

$$y = \exp\left[-4.185818 - (0.0249 \times \textit{възраст}) + (0.7464 \times \textit{пол}) + (1.0039 \times \alpha 2\textit{макроглобулин}) + 0.0302 \times \textit{хиалуронова киселина}\right] + (0.0691 \times \textit{билирубин}) - (0.0012 \times \textit{ГГТ})]$$

$$Hepascore = \frac{y}{1+y},$$

където възрастта се изчисляваше в години, за мъжки пол се взимаше =1; за женски = 2. Стойности ≥ 0.84 приехме за индикатор за цироза.

Forns

[7.811 - 3.131 × ln [тромбоцитен брой] × 0.781 ln [GGTP (U/L)] + 3.467 × ln [възраст (години)] - 0.014 [холестерол (mg/dL)]\]

$$\textbf{HAPRI} = \frac{\text{HA}}{\text{prothrombin index}} \text{ x100}$$

HALT-C

3.66 - 0.00995 × platelet count (10^3/mL) + 0.008 × TIMP–1 + 1.42 × log(hyaluronate)

На 66 пациента с излекуван хроничен вирусен хепатит С, изходно в стадий на значима чернодробна фиброза, цироза или декомпенсирана чернодробна цироза бяха предоставени анкети за оценка на качеството на живот (виж. Приложение). Пациенти с чернодробно заболяване със смесена генеза, пациенти с тежки придружаващи заболявания, които нарушават качеството им на живот – сърдечна, дихателна, бъбречна недостатъчност, психиатрични и онкологични заболявания или силни болки в опорно-двигателния апарат. Анкета не се предоставяше на пациентите, които не бяха подписали информирано съгласие. Въпросите в анкетата бяха заимствани от The Medical Outcomes Study Short Form (SF-36), като бяха добавени и въпроси от The Chronic Liver Disease Questionnaire (CLDQ), които са определящи за качеството по- специфично при чернодробни заболявания и понякога са определящи за поведението (напр. пруритус и мускулни крампи).

Задълбоченото проследяване на енцефалопатията не беше приоритет в настоящата разработка по ред причини: 1. минималните прояви на енцефалопатията е най- трудният за изключване признак на декомпансация поради необходимостта от многократно провеждане на количествени неврофизиологични тестове; 2. липсва стандарт за поставяне на диагнозата; 3. невъзможността при всеки пациент да се изключат редица други заболявания водещи до същите прояви; 4.предстояща промяна в критериите за енцефалопатия като признак за декомпенсирана чернодробна болест.

Статистически методи

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен със специализирана програма за биостатистическа обработка на данни IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2012, програмни езици "R", чрез RStudio и "Python", чрез JupyterNotebook. Графичните изображения, представящи статистическите данни, са изготвени с помощта на "R", GraphPad Prism 9 и SPSS.

Дескриптивна статистика: Използвахме методите на дескриптивната статистика за описание на демографската и клинична характеристика на пациентите, както и за представяне на данните от изследваните имунологични параметри с показателите на централната тенденция.

Тестове за определяне нормалността на разпределението (Kolmogorov–Smirnov, Shapiro-Wilk)

Параметрични тестове за свързани и несвързани извадки: (T-тест на Student) и за несвързани извадки (unpaired T-тест на Student).

Непараметрични тестове за свързани и несвързани извадки: В случаите с данни за разпределение, различно от нормалното, бяха извършени непараметрични тестове за несвързани извадки, посредством Wilcoxon signed-rank test, Mann-Whitney U test, ANOVA (Analysis of Variance, мултивариантен дисперсионен анализ), Kruskal-Wallis *H* test Използвахме също пермутационен тест за асоциации на Фишер (Fisher's Permutation Test) при анализа на номинални данни. Поради множеството проведени тестове, бе извършена корекция, отчитаща вероятността да се допусне грешка от първи род, наричана ниво на значимост (на грешката) и означавана с α, съгласно метода на Benjamini-Hochberg.

Корелационен анализ: за изследване на зависимост между количествени величини: За данни с параметрично разпределение

използвахме Pearson correlation coefficient, а за данни с непараметрично разпределение беше приложен Spearman's rank correlation coefficient.

ROC curve анализ: за да определим оптималните cut-off values, т. е. праговите стойности за предикция на фиброзата.

Линеен дискриминантен анализ (Linear Discriminant Analysis, LDA) и метод на дърветата за класификация и регресия (Classification and Regression Tree, CART)

Логистичен регресионен анализ: За оценка на силата на връзката между определени фактори (предиктори) и зависимата променлива формирахме математически модели. Приложихме множествен логистичен регресионен анализ, като чрез стъпкова процедура формирахме няколко модела. Изчислихме отношението на шансовете (Odds Ratio, OR), което е приблизителна мярка на рисковото отношение за попадане в съответната категория. Стойностите на OR са представени със съответния 95% доверителен интервал (95% CI). Оценена беше адекватността и точността на моделите (процент на правилно класифициране). На следващ етап, типът отговор беше разделен на две категории: не/да. Силата на връзката между потенциалното множество от независими променливи и зависимата променлива „хистологичен стадий на фиброза“ беше изследвана посредством мултиноминален логистично регресионен модел. Оценено бе и евентуалното взаимодействие между използваните в модела променливи по мултипликативната скала.

4. Резултати

При изследваните пациенти, както и в други публикации от българската популация най- честият генотип беше 1 (n=496), следван от генотип 3 (n=62).

Изследвахме връзка между вирусния товар на изходно ниво от една старана, и генотип, пол, степен на чернодробна увреда, възраст, както и с MELD и CPS, от друга. От коефициент на Spearman установихме слаба обратна корелация на вирусния товар с диагноза, MELD и CPS. С цел да коригираме взаимното влияние на променливите проведохме множествен логистичен регресионен анализ, като включихме всички променливи заедно, като моделът не показа сигнификантно влияние – фиг.1 Изследвахме и наличие на връзка между HCV RNA и TBO, като проведохме логистичен регресионен анализ, но установихме, че изходните стойности на вирусния товар не оказват влияние върху TBO (p=0,14). Тряба да се има предвид и неправилната форма на разпределение на таргетната променлива – HCV RNA.

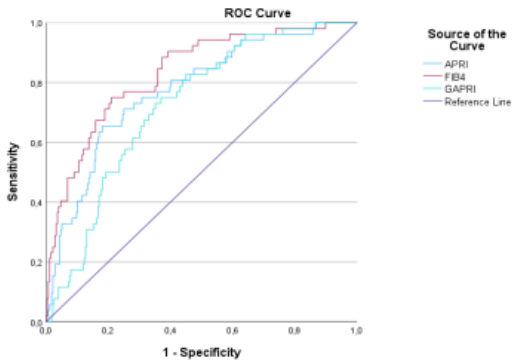
Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power[b]
					Lower Bound	Upper Bound			
Intercept	6319158,757	3113121,295	2,030	,046	117503,120	12520814,394	,052	2,030	,518
Child	-540020,529	309260,973	-1,746	,085	-1156099,980	76058,921	,039	1,746	,407
възраст1	-2453,447	30454,516	-,081	,936	-63121,955	58215,060	,000	,081	,051
MELD2	-126283,296	124380,189	-1,015	,313	-374061,339	121494,747	,014	1,015	,171
[пол=1,0]	1622826,825	1065210,981	1,523	,132	-499182,265	3744835,916	,030	1,523	,324
[пол=2,0]	0[a]								
[диагноза=2,0]	-1039211,729	1097391,253	-,947	,347	-3225327,208	1146903,750	,012	,947	,155
[диагноза=3,0]	0[a]								

Фиг.2 Връзка на HCV RNA с изходни променливи

Корелация на използваните в проучването показатели и скорови системи за фиброза с чернодробната биопсия.

При пациентите с хистологична верификация на напредналостта на чернодробната болест (n=385) съпоставихме хистологичния резултат със

стойностите на APRI, GAPRI, FIB-4 като проведохме ROC анализ. Както се вижда от фиг. 1 неинвазивните методи могат да разграничават чернодробна цироза от по- ниските стадии на фиброза площ под кривата: APRI -0,776 (p=0,001); FIB-4 – 0,832 (p=0,001), GAPRI – 0,725 (p=0,001), като съответно за разграничаване на F3 от двата по- ниски класа стойностите бяха съответно 0,746 (p=0,001), 0,769 (p=0,001) и 0,725 (p=0,001). Данните от резултатите от фиг. 1 представят и бинарен проблем – F4 не може да се разгранични от F3, нито F1 от F2.



1А

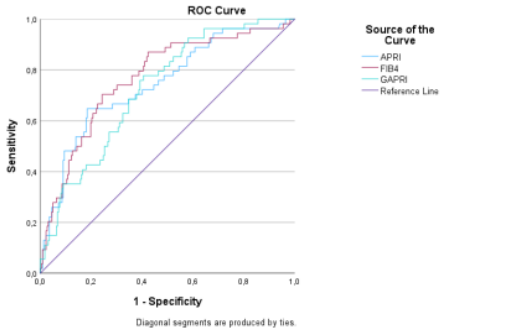
Area Under the Curve

Result Variable (s)	Area	Std. Error[a]	Asymptotic Sig.[b]	Asymptotic 95% Lower Bound	Asymptotic 95% Upper Bound
APRI	0,776	0,035	0,000	0,707	0,844
FIB4	0,832	0,030	0,000	0,773	0,891
GAPRI	0,725	0,033	0,000	0,659	0,790

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

1Г



1Б

Area Under the Curve

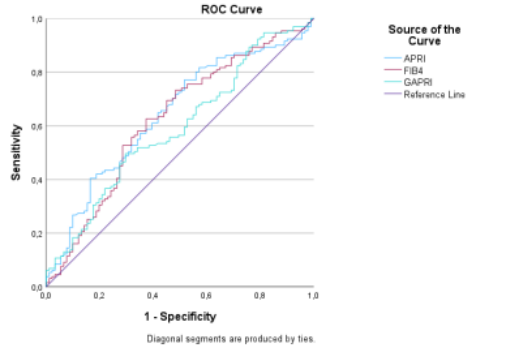
Result Variable (s)	Area	Std. Error[a]	Asymptotic Sig.[b]	Asymptotic 95% Lower Bound	Asymptotic 95% Upper Bound
APRI	0,746	0,039	0,000	0,670	0,821
FIB4	0,769	0,036	0,000	0,698	0,841
GAPRI	0,725	0,035	0,000	0,656	0,794

The test result variable(s): APRI has at least one tie

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

2Д



1В

Area Under the Curve

Result Variable (s)	Area	Std. Error[a]	Asymptotic Sig.[b]	Asymptotic 95% Lower Bound	Asymptotic 95% Upper Bound
APRI	0,643	0,038	0,000	0,570	0,717
FIB4	0,625	0,039	0,001	0,550	0,701
GAPRI	0,591	0,039	0,022	0,515	0,666

The test result variable(s): APRI, FIB4, GAPRI has at

a. Under the nonparametric assumption

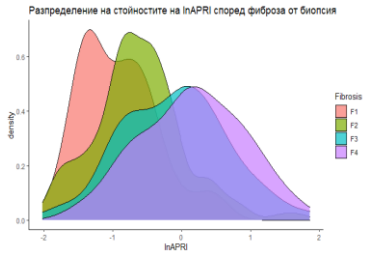
b. Null hypothesis: true area = 0.5

1Е

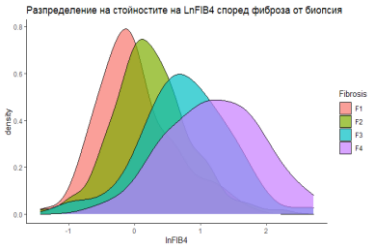
Фиг.1 ROC анализ на неинвазивни методи за напреднала болест –1А – цироза спрямо останалите степени на фиброза; 1Б - F3 спрямо F2 и F1; 1В- F1 спрямо F2 и специфичност и чувствителност на неинвазивни методи за напреднала болест –1А – цироза спрямо останалите степени на фиброза; 1Б - F3 спрямо F2 и F1; 1В- F1 спрямо F2

Поради непараметричното разпределение на неинвазивните скорове, за да увеличим достоверността на анализа, логаритмувахме с натурален логаритъм GAPRI, APRI, FIB-4 като получените стойности следваха

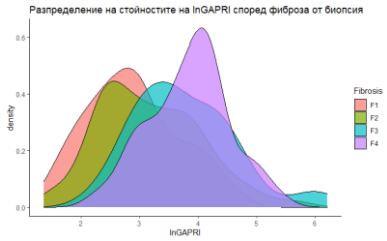
нормалното Гаусово разпределение показано на хистограмите, представени на фиг. 2 , фиг. 3 и фиг. 4



Фиг. 2 Разпределение на lnAPRI спрямо фиброза от хистология

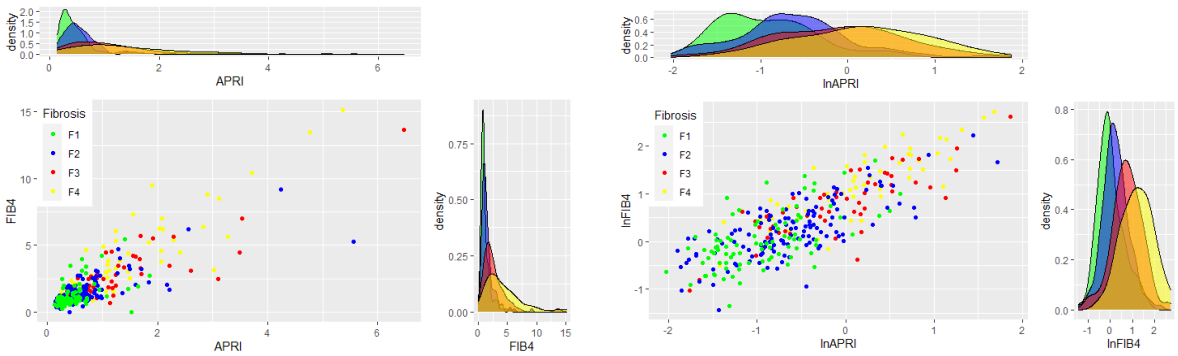


Фиг. 3 Разпределение на lnFIB-4 спрямо фиброза от хистология



Фиг. 4 Разпределение на lnGAPRI спрямо фиброза от хистология

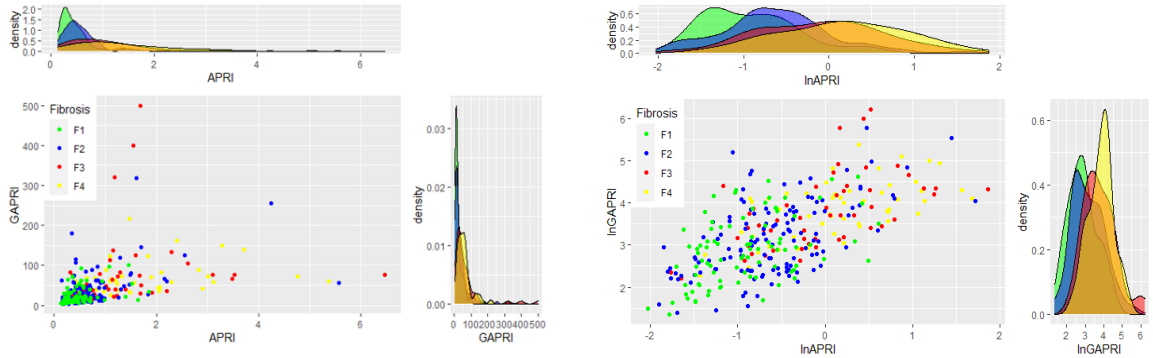
На фиг. 5 и фиг. 6 са представени чрез точкови диаграми връзките между различните биологични неинвазивни тестове за определяне на чернодробна фиброза. При изследване на lnAPRI и lnFib-4 установихме добра корелация между APRI и FIB-4 като зависимостта е линейна и положителна.



А *Б*

Фиг. 5 Представяне връзката между биологични неинвазивни тестове в точкова диаграма А- APRI/FIB-4; Б- lnAPRI/lnFIB-4

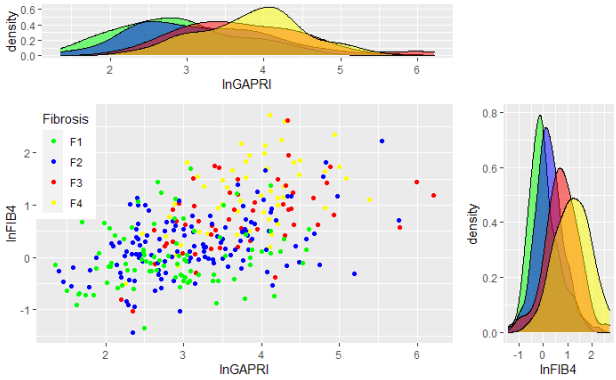
Зависимостта между APRI и GAPRI показа слаба зависимост с потенциални отделени стойности.



А Б

Фиг. 6 Представяне връзката между биологични неинвазивни тестове в точкова диаграма А- APRI/GAPRI; Б- lnAPRI/lnGAPRI

Зависимостта между GAPRI и FIB-4, изразена с точковата диаграма на фиг. 7 показа слаба, положителна зависимост и наличие на отделени стойности.



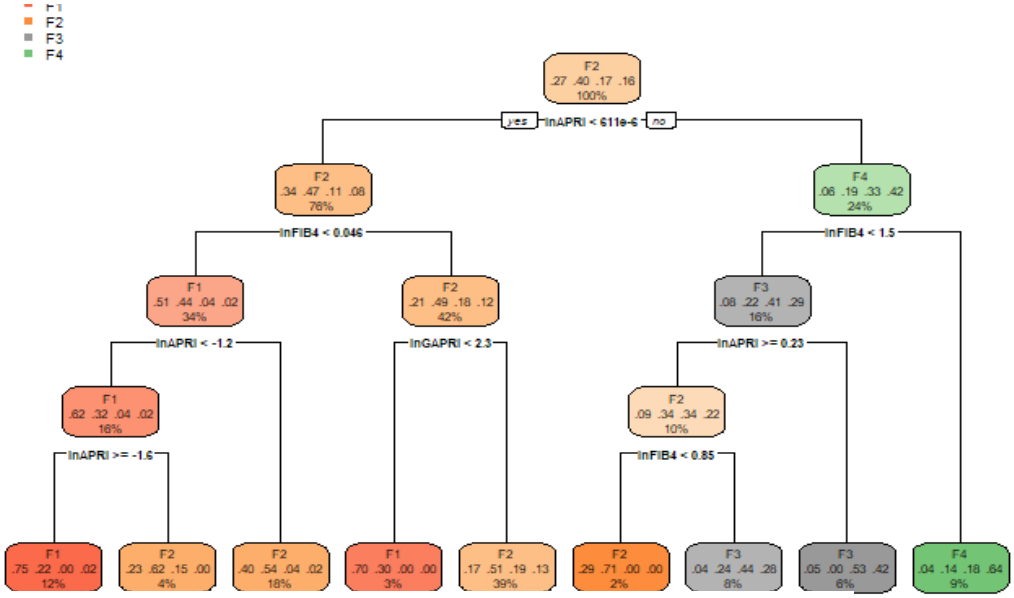
Фиг. 7 Представяне връзката между биологични неинвазивни тестове в точкова диаграма lnGAPRI/lnFIB-4

С цел да проверим дали по стойностите на FIB-4, GAPRI и APRI можем да предскажем степента на фиброза, използвахме класификационен анализ от групата на Машинното обучение: Дървета за Класфикация и Регресия (CART). Моделът намира най-добрите cut-off стойности на независимите променливи с цел най-точна класификация, генерират се

правила, с помощта на които моделът взема решение, даден към кой клас фиброза може да бъде причислен, това се визуализира чрез „дърво-подобна” структура (фиг. 8). При проверка на точността на модела установихме, че точността на диагнозата е средно 44 % за четирите класа (F1- F4). Моделът е построен на базата на петкратна крос валидация и резултатите показват, че 3-те скора не могат да бъдат използвани с достатъчно добра точност като предиктори на всеки един от 4-те класа. Но когато трябва да се разграничи 4-ти клас фиброза, точността на класификацията е доста по-добра 73% (балансирана точност).

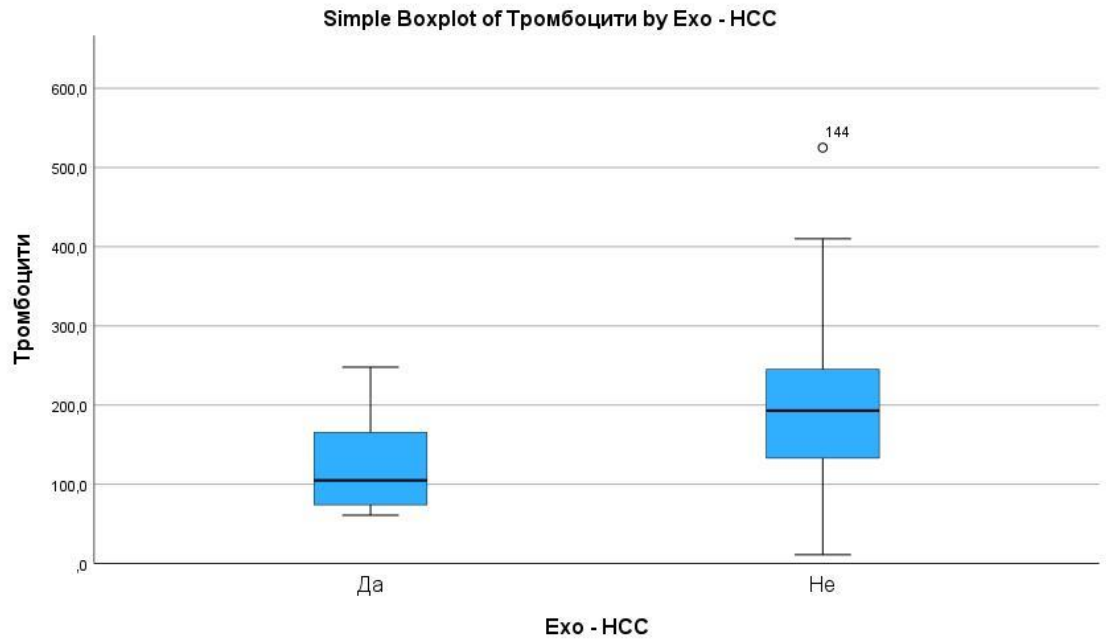
Таб 3. Чувствителност. специфичност, положителна и отрицателна предиктивна стойност

Class	F1	F2	F3	F4
Sensitivity	0,371	0,754	0,000	0,635
Specificity	0,915	0,513	1,000	0,832
Pos Pred Value	0,623	0,508	NaN	0,418
Neg Pred Value	0,794	0,758	0,834	0,923
Prevalence	0,274	0,400	0,166	0,160
Detection Rate	0,102	0,302	0,000	0,102
Detection Prevalence	0,163	0,594	0,000	0,243
Balanced Accuracy	0,643	0,633	0,500	0,733



Фиг. 8 Анализ за определяне на специфичността и чувствителността на биологичните методи за фиброза

Установихме, че пациентите с данни за чернодробна стеатоза от ехографското изследване бяха с по- нисък тромбоцитен брой на изходно ниво (p= 0,001) и при проследяване (p= 0,001). Също така намерихме, че пациентите с HCC (n=8) са с значително по-ниски стойности на тромбоцитите (p=0,014), като тази сигнификантност се запазва и при проследяване (p=0,006). Разликите са показани с бокс-плот на фиг. 9.



Фиг. 9 Разлика в стойностите на тромбоцитите спрямо наличие на HCC

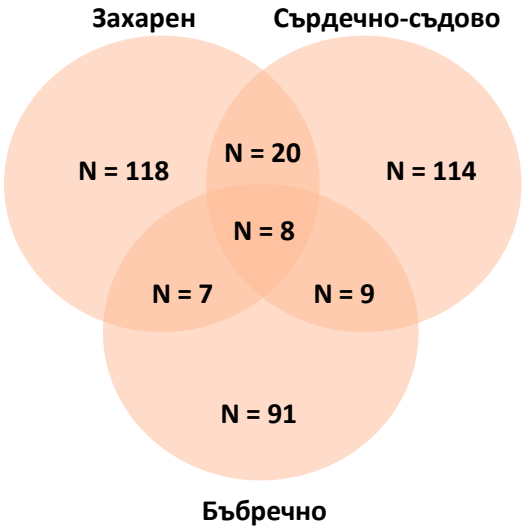
Динамика в рутинни показатели при пациентите без придружаващи заболявания или смесена генеза на чернодробното заболяване

В проучената група се срещаха редица заболявания и състояния, които по литературни данни се свързват с екстрахепатални прояви, но имаше трима пациента, при които различните феномени (криоглобулинемия, тромбоцитемия), след провеждане на допълнителни изследвания и консултации, не можеха да се асоциират с друго заболяване. С цел намаляване на влиянието върху показателите при проследяване, от проследените пациенти изключихме тези, които бяха диагностицирани с поне едно придружаващо заболяване (n=365) от посочените в таблицата (таб. 4).

Заболяване	Бройка (n)	Процентно (%)
Захарен диабет	118	23
Сърдечно-съдово	114	22,7
Хематологични*	21	4,2
Бъбречни**	91	18,2
Автоимунни***	109	21,8
Други****	365	100

*Таб. 4 Придружаващи заболявания; *Таласемия, глюкозо-6 фосфат дехидрогеназен дефицит, хемофилия, болест на фон Вилебранд; **хронично бъбречно заболяване, хрониодиализа, трансплантация; ***Орган-специфични и системни;****Онкологични, онкохематологични, хронични възпалителни заболявания на белите дробове, ГИТ, жлъчен мехур, жлъчни пътища или панкреас, психични заболявания*

Всеки от пациентите с придружаващи заболявания, имаше заболяване, което попадна в групата „Други“, тоест всеки пациент с придружаващо заболяване имаше поне още едно заболяване, което можеше да повлияе в резултатите от по- нататъшните изследвания. За по- ясно представяне в таб. 5 сме описали хроничните заболявания, които се срещат заедно с най- голяма честота.



Фиг. 10 Брой пациенти с коморбидитет

От пациентите при 34,1 % (n=171) се установи положителен резултат за anti-HBcor tot. Сравнихме биохимичните показатели при тези болни, проведохме Fisher-Freeman-Halton тест, като не установихме значими разлики в стойностите, тоест нямаше значима разлика в тежестта на болестта при пациентите с прекарана инфекция в миналото с вирусен хепатит В.

Проследяване на рутинни изследвания

Изследвахме на изходно ниво и при проследяване стойностите на задължителните лабораторни показатели за оценка на чернодробно заболяване – тромбоцитен брой, функционални чернодробни проби – чернодробни ензими (АСАТ, АЛАТ, ГГТ), рутинни изследвания за оценка на протеосинтетичната чернодробна функция – протромбиново време, албумин, оценихме бъбречната функция – серумен креатинин и креатининов клирънс. Представяме стойностите на пациентите, при които до минимум се ограничили възможността за отклонения от друга причина освен изследваната – чернодробно заболяване при хронична HCV инфекция (n=138). В трите подгрупи пациентите бяха както следва – хроничен хепатит – 74 пациента, чернодробна цироза – 33 пациента, декомпенсирана чернодробна цироза – 31 пациента.

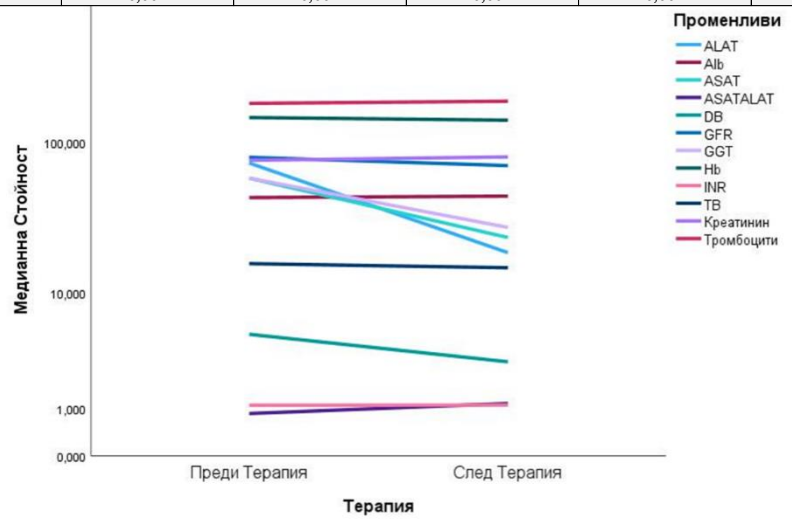
Пациентите с повишени стойности на алкална фосфатаза ги изключихме за да сведем до минимум вероятността отклоненията да се дължат на друго заболяване или на друга етиологична единица. Стойностите на албумин ги интерпретирахме в контекста на тези на общия белтък. От всички изследвани маркери нормално Гаусово разпределение следваха само стойностите на тромбоцитите. Останалите показатели имат непараметрично разпределение. По тази причина е цитирана медианата с минимални и максимални стойности. Сигнификантно се подобриха

стойностите на тромбоцитите, общ билирубин, директен билирубин, албумин. Значима промяна не достигнаха стойностите на INR. Медианите и сигнификантността в промените са изразени на таб. 5 и на фиг. 11.

Таб. 5 Динамика в рутинни показатели

	Hb1	Hb2	Thr1	Thr2	CREAT1	CREAT2
Median	146	140	180	186	77	81
Minimum	8	89	2	11	45	47
Maximum	181	178	407	380	197	253
p-value (2-1)	0,001		0,001		0,022	

	ASAT1	ASAT2	ALAT1	ALAT2	GGT1	GGT2	TB1	Tb2	Alb1	Alb2	INR1	INR2
Median	59	24	74	19	59	28	16	15	44	45	1,11	1,12
Minimum	19	10	0	8	0	3	0	5	25	28	0,85	0,90
Maximum	353	94	374	146	411	293	97	147	56	54	3,10	2,32
p-value (2-1)	0,001		0,001		0,001		0,001		0,001		0,400	



Фиг. 11 Графично представяне на динамиката на промяна на някои показатели

Оценихме в началото на терапията и при проследяване броят на пациентите с поне едно усложнение от изброените : ЕП, асцит, варици на хранопровода или стомаха. Пациентите с варици бяха разделени в 3 групи: без данни за варици, с варици и с варици, които са били източник на кръвоизлив или се е наложило провеждане на ЕВЛ поради висок риск от

кървене. По тест на Мак Немар в бройката на пациентите с асцит изходно (n=12) и неусложнени варици изходно (n=36), установихме несигнификантно намаление, като при един пациент, диагностициран с варици преди началото на терапията, се е наблюдаваше усложнение след иницииране на терапията. Броят на пациентите с иктер (n=17), намалява до (n=4), като промяната е сигнификантна съгласно Мак Немар (p=0,001). (Таб. 6)

Таб. 6 Усложнения преди терапия и след постигане на ТВО

Усложнение		Брой
Енцефалопатия	Да	3
	Не	135
асцит	Да	12
	Не	126
иктер	Да	17
	Не	121
варици	Да	36
	Не	95
	Усложнени	7

А

Усложнение		Брой
Енцефалопатия	Да	7
	Не	131
Асцит	Да	8
	Не	130
Иктер	Да	4
	Не	134
Варици	Да	35
	Не	95
	Усложнени	8

Б

Усложне	Тест	Two-Sided p
Асцит = Да	Mid-p Adjusted	>0,05
Асцит 2 = Да	McNemar	>0,05
иктер = Да	Mid-p Adjusted Binomial	0,000
Иктер 2 = Да	McNemar	0,000
варици = Да	Mid-p Adjusted Binomial	>0,05
Варици 2 = Да	McNemar	>0,05
ЕП* = Да	Mid-p Adjusted Binomial	>0,05
ЕП 2 = Да	McNemar	>0,05

В ЕП - енцефалопатия*

Пациентите, на които беше проведена ТЕ при проследяване, бяха изходно разпределени спрямо напредналостта на чернодробната болест както следва: хроничен хепатит (n= 28), чернодробна цироза (n=11), декомпенсирана чернодробна цироза (n=7). Резултатите от проследяването поне 6 месеца след постигане на ТВО показаха: F0-F1 бяха 24 човека, F2 – 4 пациенти, F3 – 4 пациенти, F4 – 14 пациента.

Пациентите, на които беше проведена Strain еластография бяха изходно разпределени спрямо степента на чернодробна увреда както следва : хроничен хепатит – 30 пациента, чернодробна – 11 пациента, декомпенсирана чернодробна цироза – 9 пациента. Резултатите от проследяване поне 6 месеца след ерадикация на инфекцията бяха: F0-F1 – 20 пациента, F2 – 8 пациента, F3 – 7 пациента, F4 – 17 пациента.

От пациентите без други придружаващи заболявания, при 39 към терапията с ДДАС беше добавен и Рибавирин, вкл. и при 5 човека, от провеждащите лечение с пангенотипен режим. Дневната доза беше 1000 мг. при телесно тегло <75 кг. и 1200 мг. при телесно тегло >75 кг. С тестът на Wilcoxon не установихме закономерно различие в общия билирубин, а в стойностите на хемоглобинът имаше сигнификантен, но не клинично-значим спад (от медиана на изх. стойности 148 g/l, до 142 g/l; p= 0,03).

Таб. 7 Промени в хемоглобин и общ билирубин, изходно и при проследяване, на пациенти, приемали Рибавирин

	Tb2 - TB1	Hb2 - Hb1
Z	-1,020[b]	-1,848[b]
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,308	0,065
Exact Sig. (2-tailed)	0,314	0,065
Exact Sig. (1-tailed)	0,157	0,032
Point Probability	0,002	0,001
a. Wilcoxon Signed Ranks		
b. Based on positive		

		Hb1	Hb2
Mean		146,821	141,49
Median		148,000	142,00
Std. Deviation		16,6700	17,154
Variance		277,888	294,257
Range		74,0	71
Minimum		102,0	105
Maximum		176,0	176
Percentiles	25	137,000	131,00
	50	148,000	142,00
	75	160,000	153,00

Рутинните скорове за фиброза също показаха значимо намаляване в стойностите. Проведохме и линеен регресионен анализ, от който установихме, че всеки следващ клас на фиброзата се свързва със средно намаляване на APRI с 0,44 единици, (поне 6 м.) след приключване на терапията, спрямо изходното ниво, p=0,001 (таб. 8). При FIB-4 това намаляване се увеличава с 1,35 за всеки клас (отново са сравнени изходните нива спрямо тези при проследяване), p=0,001 (таб. 9)

Таб. 8 Промяна при проследяване в А- APRI; Б- FIB-4

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,517	,304		1,699	,093
	Фиброза (според	**-,437**	,106	-,401	-4,135	**,000**

A

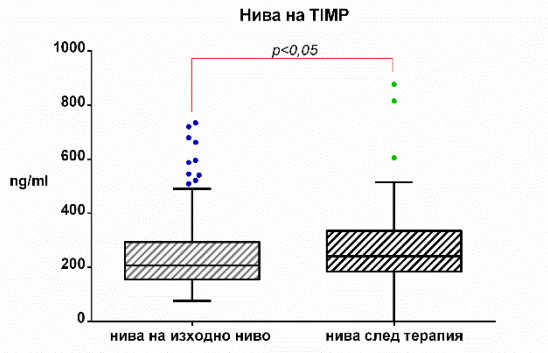
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	2,940	1,081		2,721	,008
	Фиброза (според	**-1,345**	,375	-,355	-3,585	**,001**

B

Връзка на специализирани лабораторни показатели

Установиха се статистически значими разлики в числовите променливи преди терапия и поне 6 м. след постигане на ТВО. Тъй като имат непараметрично разпределение са описани чрез медиана с минимални и максимални стойности.

Средните стойностите на TIMP-1 при 138 човека бяха 211,5 ng/ml (Min-Max: 0 – 899,2 ng/ml). При второто изследване на TIMP-1 на 85 от първоначално изследваните пациенти средните стойности се бяха увеличили на 241,4 ng/ml (Min-Max: 0,1 – 876,9 ng/ml), p = 0,001, според тестът на Уилкоксън за свързани извадки. Не установихме връзка между стойностите на TIMP-1 с възрастта, пола на пациентите или с изходната HCV RNA.



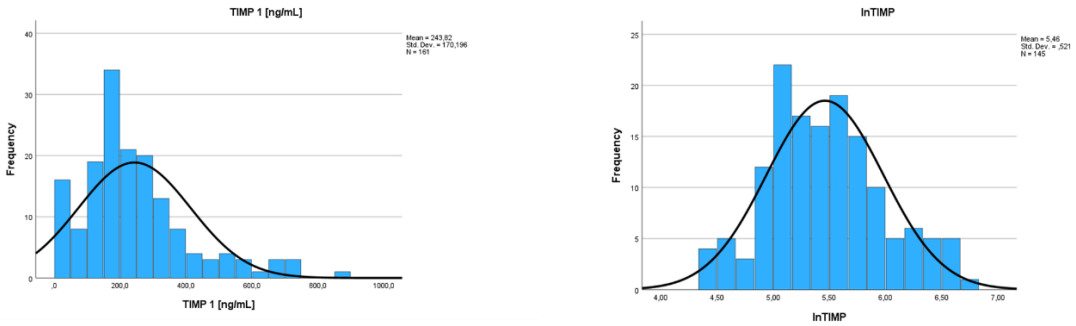
Фигура 12 Разлики в TIMP-1 на изходно ниво и след ерадикация на HCV

Средната промяна в стойностите на TIMP-1 беше 70,5 ng/ml (Min-Max -299,3 – 729,7 ng/ml). Установиха се два клъстера от пациените – такива, при които намалява TIMP-1 (n=29) и такива, при които се покачва (n=56), медианите са посочени на таб. 9.

Таб. 9 Стойности на TIMP-1 разделени при пациентите, при които се покачва и спада

	TIMP-1 изходно	TIMP-1 проследяване	p-стойност
Медиана намаляващи изходно	252,4 ng/ml	185,4	p=0,001
Медиана намаляващи проследяване	165,9	309,2	p=0,001

Потърсихме дали може някоя от изходните променливи да предвиди динамиката в стойностите на TIMP-1. Поради това, че TIMP-1 имаше непараметрично разпределение използвахме логаритмична трансформация (фиг. 12) и проведохме тестът на Колмогоров – Смирнов като установихме, че lnTIMP-1 следва параметрично разпределение таб. 10.



Фиг. 13 Логаритмична трансформация на TIMP-1

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TIMP 1 [ng/mL]	0,146	145	0,000	0,848	145	0,000
lnTIMP	0,065	145	,200*	0,984	145	0,086

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

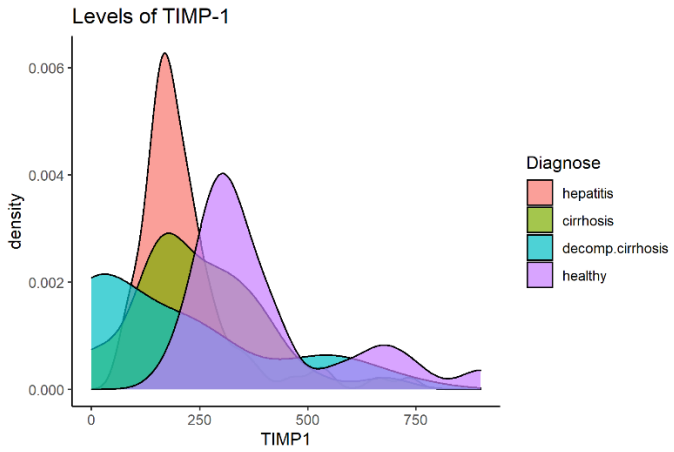
Таб. 10 Тест на Колмогоров-Смирнов за проверка на нормално разпределение на lnTIMP-1

За да проверим има ли зависимост между нивата на TIMP-1 с тези на ГГТ и креатинин проведохме множествен линеен регресионен анализ. Установихме положителна корелация между нивата на ГГТ и креатинин, p= 0,012; p=0,001. Предложеният от нас модел обяснява около 20 % от дисперсията в нивата на логаритмувания TIMP-1. С нарастване на единица ГГТ lnTIMP нараства с 0.001, а при креатинина - с 0.009. Установихме значима, но слаба обратна корелация със стойностите на креатинина (ρ= -

0,257, p=0,018), пикочната киселина (ρ= -0,273, p=0,02) и слаба положителна корелация с креатининовия клирънс (ρ=0,293, p=0,007).

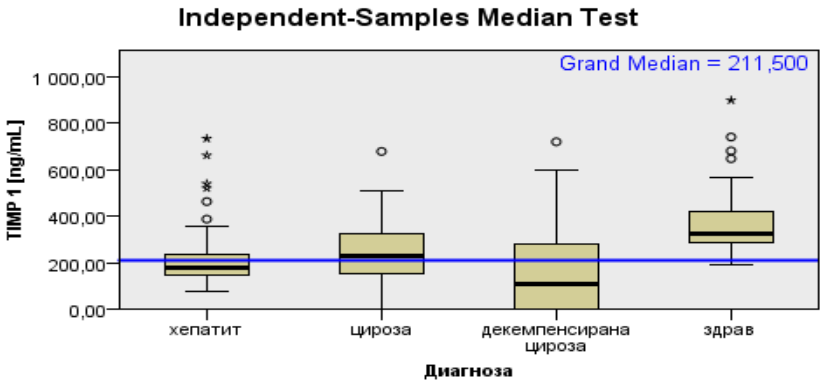
При пациените, при които TIMP-1 се понижаваше (n= 29) стойностите на AST бяха по- високи (p=0,033), а тези на албумин са по- ниски (p=0,02) в сравнение с тези, при които се повишава (n=56).

На фиг. 14 са показани диаграми на плътностно разпределение, от които се вижда че пикът на ТИМП-1 при здрави е изместен към по- високите стойности и че на изходно ниво не може да служи като предиктор на диагноза.



Фиг. 14 Хистограма на плътностно разпределение на TIMP-1 в групите

Потърсихме връзка между стойностите на TIMP-1 и напредналостта на чернодробната болест като проведохме тест на Крускал-Уолис и установихме, че има разлика между всички групите (p=0.001), демонстрирано на фиг. 15 чрез барплотове.



Total N	161
Median	211,500
Test Statistic	24,461
Degrees of Freedom	3
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,000

Фиг. 15 Разлика в изходните стойности на TIMP-1 по групи

След като приложихме корекция за множествено тестуване по Bonferroni установихме, че стойностите на TIMP-1 на изходно ниво са значимо по- високи при здрави доброволци, отколкото при пациентите с хроничен хепатит, чернодробна цироза и декомпенсирана чернодробна цироза, като зависимостите са посочени на фиг. 16

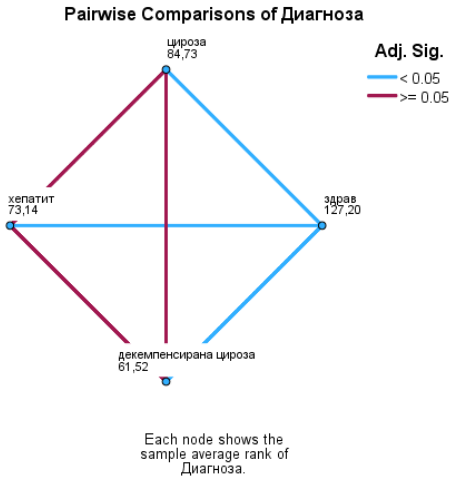
Както е видно от фиг. 16, не се установиха различия между болните спрямо напредналостта на болестта TIMP-1.

Pairwise Comparisons of Диагноза

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.[a]
декемпенсирана цироза-хепатит	11,626	9,969	1,166	,244	1,000
декемпенсирана цироза-цироза	23,211	11,655	1,991	,046	,279
декемпенсирана цироза-здрав	-65,680	12,824	-5,122	,000	,000
хепатит-цироза	-11,585	9,754	-1,188	,235	1,000
хепатит-здрав	-54,054	11,124	-4,859	,000	,000
цироза-здрав	-42,468	12,657	-3,355	,001	,005

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.
Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,050.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

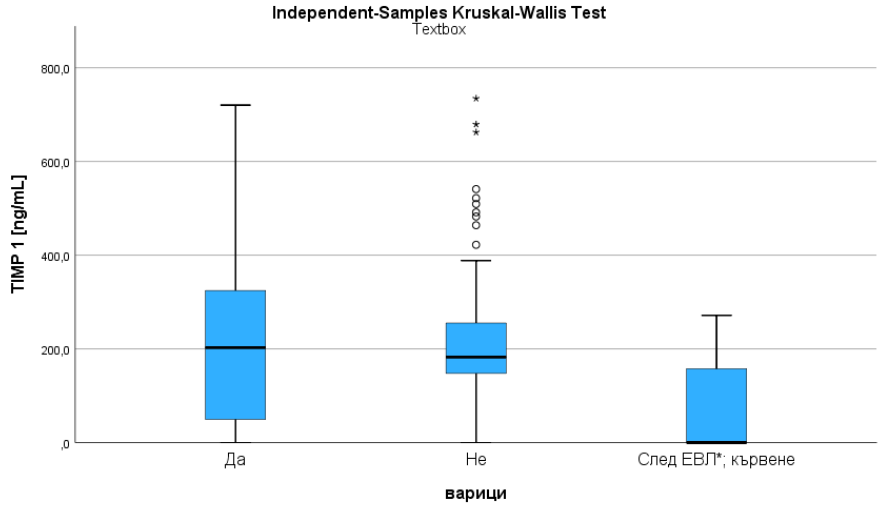


Фигура 16 Възможност на TIMP-1 да разграничи всяка група от останалите

Изходните стойности на TIMP-1, както и тези в хода на проследяването, не достигнаха сигнификантна разлика при пациентите, при които се установиха белези на портална хипертония, от стойностите при тези, които бяха с нормодинамичен портален кръвоток. Въпреки това се установи разлика в стойностите на TIMP-1 при пациентите с усложнения на чернодробната болест, когато бяха разделени по наличието на варици.

Както се вижда на фиг. 17 и фиг. 18 пациентите преживяли кръвоизлив от вариците на хранопровода в миналото, както и тези, при които се е

наложило провеждане на ЕВЛ за профилактика или лечение на кръвоизлив са със значимо по- ниски стойности на TIMP-1, отколкото здравите доброволци (p=0.049). Стойностите на TIMP-1 не достигнаха значимост при пациентите с варици, които не налагаха ендоскопско лечение, в сравнение с пациените без варици.



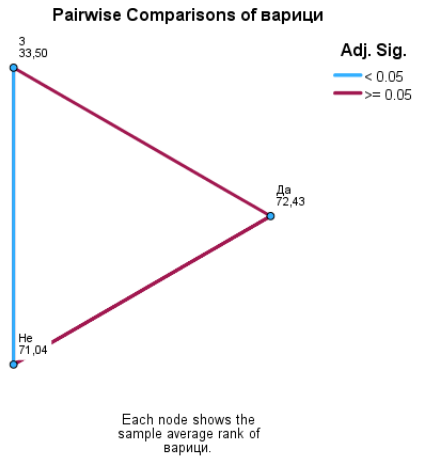
Pairwise Comparisons of варици

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.[a]
ЕВЛ; кървене-Не	37,542	15,646	2,399	,016	,049
ЕВЛ; кървене-Да	38,931	16,503	2,359	,018	,055
Не-Да	1,388	7,819	,178	,859	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.
Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,050.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Фиг. 17 Разлика в стойности на TIMP-1 при пациените без варици, с варици, с варици, причинили кръвоизлив или след ЕВЛ (ендоскопско връзково лигиране)

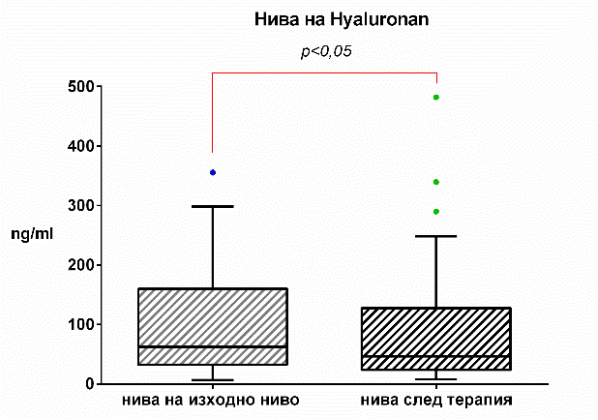


Фиг. 18 Възможност на TIMP-1 да отграничи варици

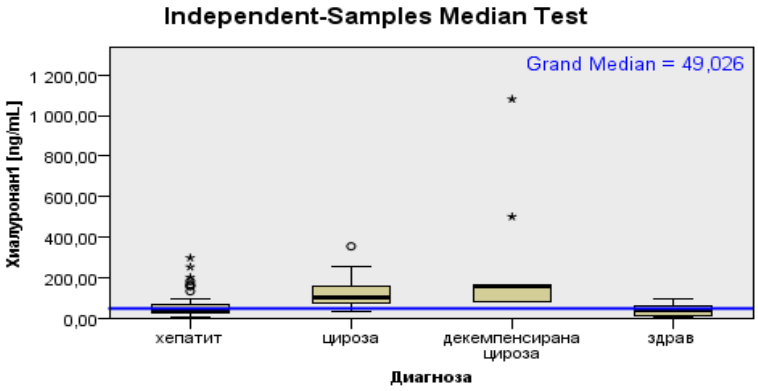
Не се установиха статистически значими разлики в стойностите на TIMP-1 в зависимост от наличието на иктер или асцит.

При проследяването установихме, че стойностите на TIMP-1 не се различават при пациентите провеждали различни лечения. Искахме да проверим дали има разлика в показателите при проследяване на пациентите спрямо стойностите на TIMP-1. Установихме статистическа значимост за AST и албумин. Разделихме стойностите на TIMP-1: високи/ниски и установихме, че пациентите с високи стойности на TIMP-1 имат по- ниски стойности на AST и по- високи на албумин.

HA беше изследвана при 75 пациента изходно - 49,03 ng/ml (Min-Max: 6,71–1080,6 ng/ml), а при проследяване върху 48 пациента спадна до 46,8 ng/ml (Min-Max: 8,24– 482,05 ng/ml) p = 0,049.



Фигура 19 Разлики в нивата на HA на изходно ниво и след ерадикация на HCV



Total N	98
Median	49,026
Test Statistic	23,037
Degrees of Freedom	3
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,000

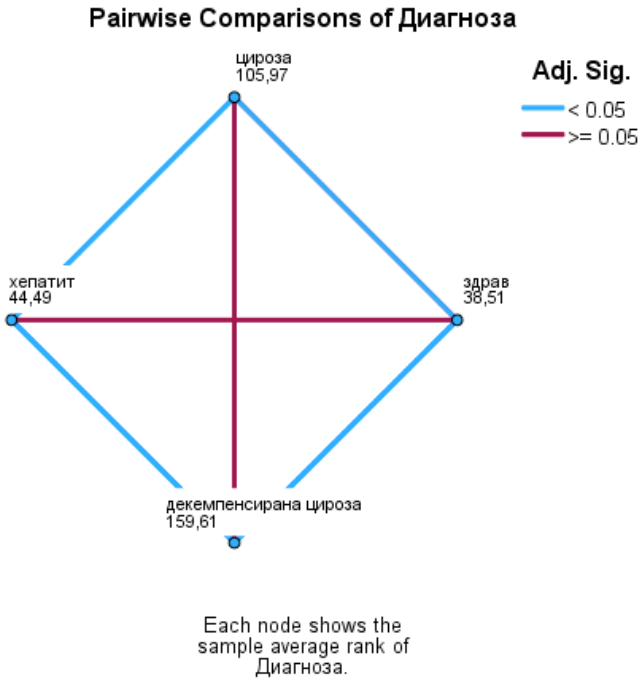
Фиг.20 Разлика в медианите по подгрупи в стойностите на HA

На фиг. 20 е демонстрирано, че стойностите на HA достигнаха статистически значима разлика при пациените с различни диагнози.

При разделяне по подгрупи се установи, че статистическа значимост беше налична при здрави и пациенти с цироза (p=0,003) и декомпенсирана цироза

(p=0,001), но не можеше да се отдиференцира компенсирана от декомпенсирана чернодробна цироза при изследваните пациенти. За онагледяване на значимостите е приложена фиг. 21

Pairwise Comparisons of Диагноза					
Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.a		
здрав-хепатит	0,568	0,451	1		
здрав-цироза	12,386	0	0,003		
здрав-декемпенсирана цироза	15,245	0	0,001		
хепатит-цироза	9,502	0,002	0,012		
хепатит-декемпенсирана цироза	12,359	0	0,003		
цироза-декемпенсирана цироза	0,137	0,711	1		
Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.					
Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,050.					
a Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.					

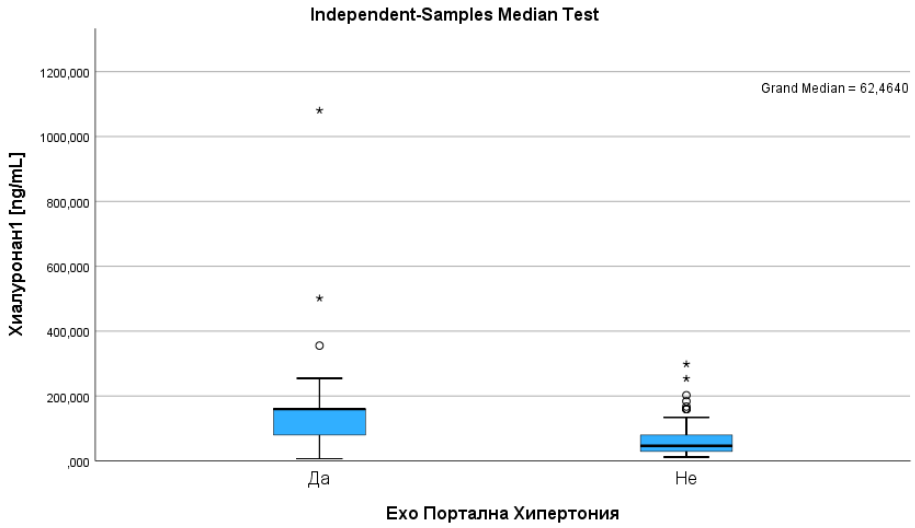


Фиг. 21 Разлики в стойностите на HA при изследваните групи

Серумните стойности на HA показаха и различия в стойностите при пациентите с ехографски белези за портална хипертония спрямо останалите (фиг. 22). За разлика от α-2МГ и TIMP-1 тази зависимост се запази значима и при проследяване (p=0,004).

Independent-Samples Median Test Summary		
Total N		75
Median		62,464
Test Statistic		15,444[a]
Degree Of Freedom		1
Asymptotic Sig.(2-sided test)		,000
Yates's Continuity Correction	Chi-Square	13,489
	Degree Of Freedom	1
	Asymptotic Sig.(2-sided test)	,000

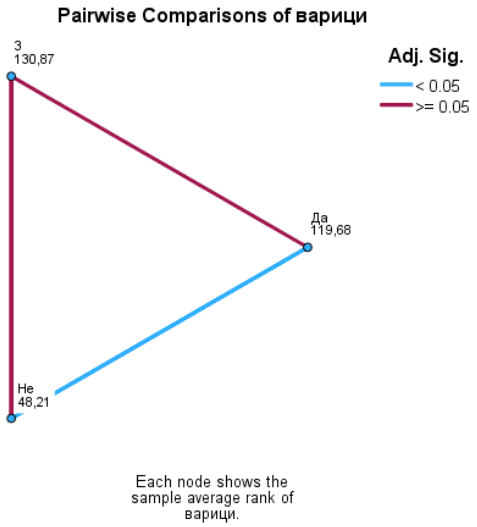
a. Multiple comparisons are not performed because there are less than three test fields.



Фиг. 22 Стойности на НА спрямо портална хипертония на изходно ниво.

НА показаше значително по- високи стойности при пациените с данни за варици, в сравнение с тези, при които не се наблюдаваха усложнения от порталната хипертония фиг. 23. Също така се установи значимо по- високи стойности при пациентите с иктер (p=0,016).

Поне 6 месеца след края на терапията получихме умерена кореалционна зависимост на НА с APRI (r= 0,599, p =0,001), GAPRI (r= 0,680; p= 0,001) и AST (r=0,475, p = 0,003). Установи се значителна корелационна зависимост между НА и FIB-4 (r=0,701, p = 0,001). Hepascore не показа значима корелация.



Pairwise Comparisons of варици			
Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.[a]
Не-Да	6,400	,011	,034
Не-3,0	3,252	,071	,214
Да-3,0	,268	,605	1,000

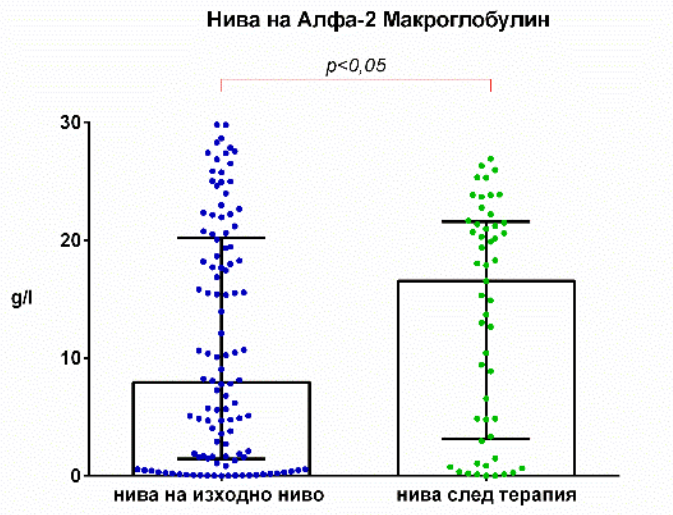
Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,050.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Фиг. 23 Стойности на НА при пациентите спрямо наличието на варици; с „3“ са маркирани усложнени варици - след ЕВЛ, след кървене

След постигане на ТВО, НА се покачи при 15 души, при които бяха по- високи стойностите на INR ((p=0,001), MELD (p=0,001), ALAT (p=0,019); ASAT (p=0,001). При останалите 33 с понижена НА, се наблюдаваше обратната динамика в определените стойности.

Средните стойности на α-2МГ преди началото на лечението (n=114) бяха 8,19 g/l (Min-Max: 0,01– 30,59 g/ml), а след успешната ерадикация на вируса (n=54) са 15,94 g/m (Min-Max: 0–30,6 g/l) p = 0,001. При α2МГ се установи разлика на изходно ниво в стойностите между групите с хроничен хепатит и с цироза (p= 0,044).



Фигура 24 Разлика в стойностите на алфа-2МГ на изходно ниво и след ерадикация на HCV

Пациентите с портална хипертония показаха по- високи стойности на α2МГ, спрямо тези с нормодинамичен портален кръвоток (p=0,033). При проследяване тази зависимост се обърна (с портална хипертония бяха с по-ниски средни стойности на α2МГ), без да достигне статистическа значимост. Освен това стойностите при пациените без варици, с варици и с варици след кървене или ЕВЛ не достигнаха статистическа значимост.

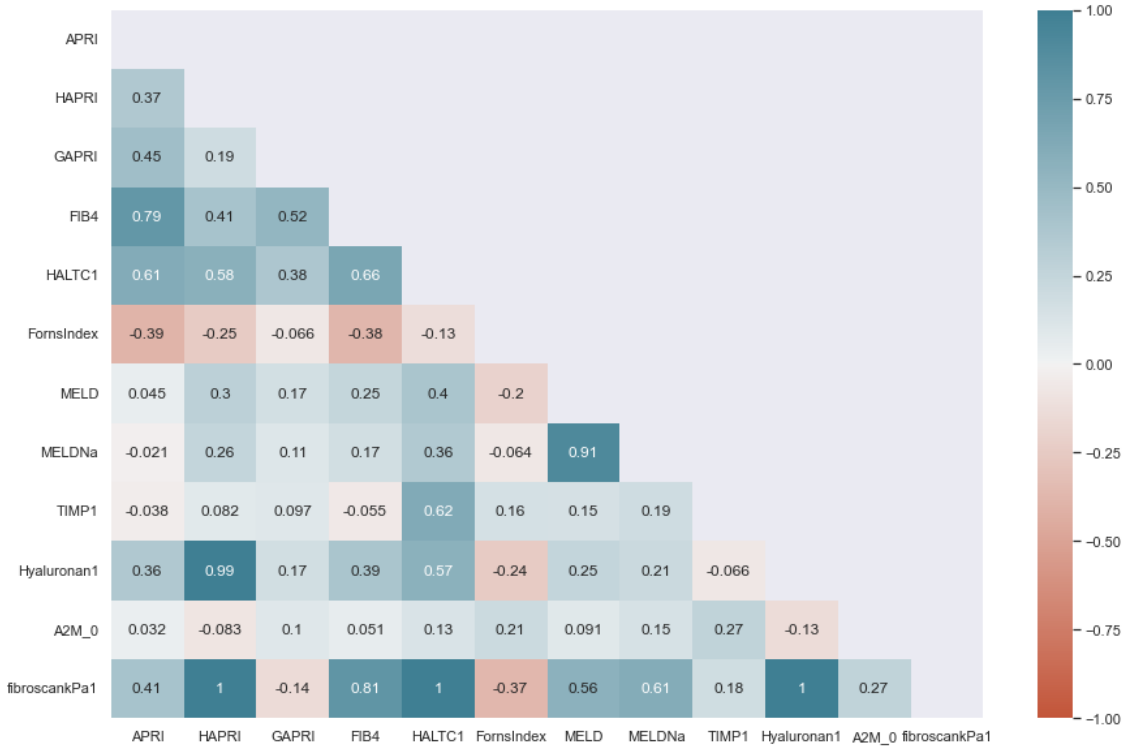
По подгрупи α2МГ значимо се покачи при пациентите без циротично преустройство (p=0,001) и пациентите в стадий на чернодробна цироза (p=0,039), но тази значимост не се запази при пациентите с декомпенсирана чернодробна цироза.

Болните в изследваната група достигнаха достоверна, но слаба корелация между стойностите на TIMP-1 и α-2МГ (ρ=0,277; p=0,001), както и умерена корелация на TIMP-1 при проследяване и α-2МГ (ρ=0,345, p=0,011). А-2МГ корелира умерено с ALT при проследяване (r= 0,355, p=0,023).

При пациентите с излекувана инфекция, α-2МГ се покачи при 45 болни и спадна при 9. Установи се, че при тези с покачил се α-2МГ, стойностите на ALT спадна и се покачи при тези, с понижение в стойностите на маркера (p= 0,007).

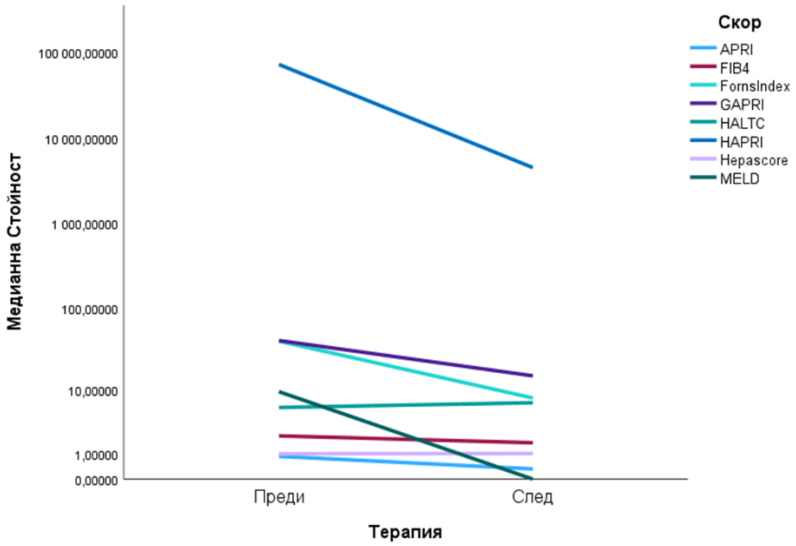
Корелационни зависимости между показателите при проследяване.

Изходно и след лечение изследвахме връзката (таб. 11 и таб. 13) между скорове за неинвазивна оценка на чернодробната фиброза, използващи биологични маркери както и тяхната динамика фиг. 25



Таб. 11 Корелации на изходно ниво

На таб.11 в гамата на синия цвят са положителните, а в гамата на червения отрицателните корелации, като интензитета се увеличава с корелационната зависимост.



Фиг. 25 Динамика в скоровете, изградени на базата на биологични параметри

Всички маркери показаха сигнификантна динамика в стойностите, показани на таб. 12 Всички показаха и подобрение във фиброзата, освен HALT-C (медиана изх. 5,92 [Min-Max: 3,75-9,48]) , а при проследяване медиана: 6,86 [Min-Max: 2,97-10,72], p= 0,05.

	APRI	APRI 2	HAPRI	HAPRI2	GAPRI	GAPRI2	FIB4	FIB4 2	HALTC1	HALTC2
Mean	1,60	0,60	115 706	8 485	63,15	31,86	3,74	3,00	6,09	6,66
Median	0,85	0,32	72 563	4 486	41,12	15,25	2,21	1,67	5,92	6,86
Std. Deviation	2,02	0,65	157 158	9 334	92,51	41,38	3,95	3,84	1,40	1,66
Range	14,54	4,48	1 149 870	47 381	925,00	239,71	21,53	32,18	5,73	7,74
Minimum	0,17	0,07	6 376	824	0,00	0,79	0,00	0,36	3,75	2,97
Maximum	14,71	4,55	1 156 246	48 205	925,00	240,50	21,53	32,54	9,48	10,72
25th Percentiles	0,52	0,22	37 299	2 285	17,59	9,34	1,00	1,01	4,91	5,16
50th Percentile	0,85	0,32	72 563	4 486	41,12	15,25	2,21	1,67	5,92	6,86
75th Percentile	1,84	0,81	159 612	12 608	80,30	37,47	5,55	3,95	7,08	7,83
p-value (2-1)	0,000		0,000		0,000		0,000		0,050	

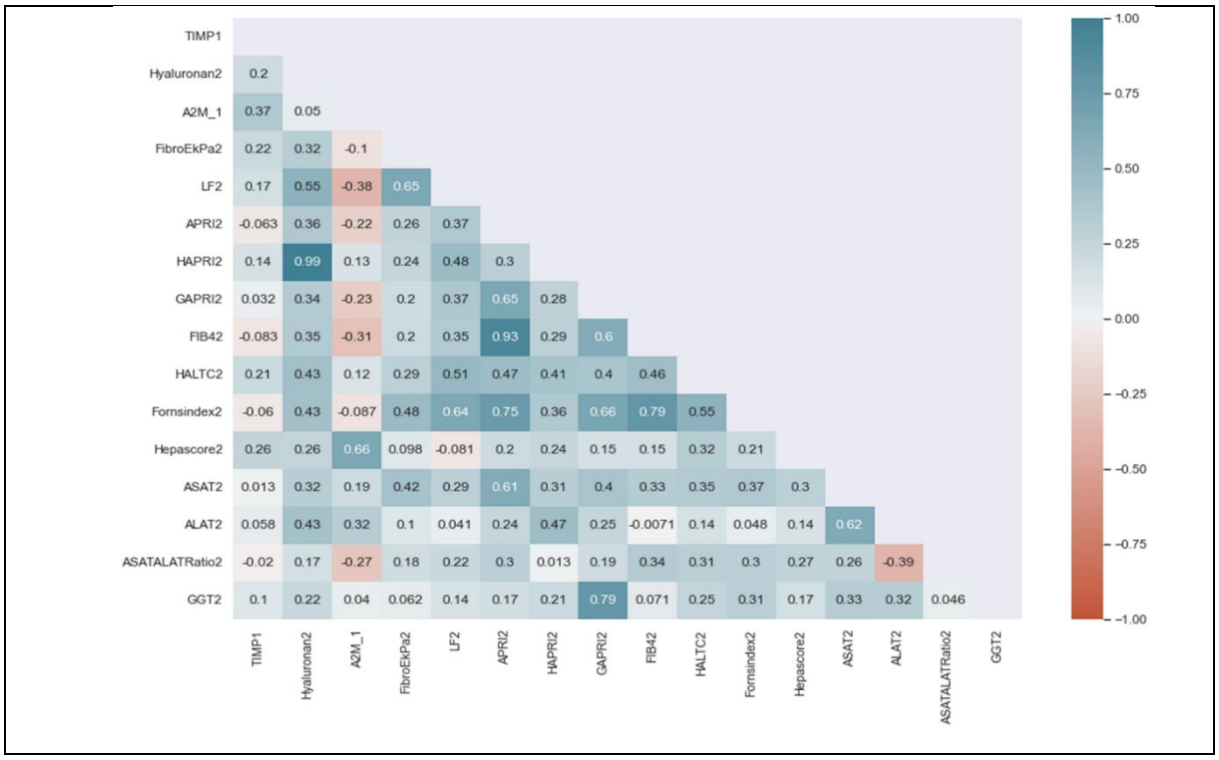
Таб. 12 Сигнификантност на динамика в скорове за наредналост на чернодробното заболяване

Докато зависимостите между GAPRI и FIB-4 (r=0,517; p=0,001), както и между GAPRI и APRI (r=453, p = 0,001) бяха умерени на изходно ниво, установихме, че при проследяване са значими: между GAPRI и FIB-4 (r=0,765; p=0,001), както между GAPRI и APRI (r=0,797; p=0,001). Ананлизът откри, че GAPRI умерено корелираше с общ (r= 0,464; p= 0,001), директен билирубин (r=0,478; p=0,001) и INR (r= 520, p=0,001) при проследяване.

HAPRI след терапия показа умерена по сила връка с FIB-4 (r=0,668, p= 0,001) и с APRI (r=550, p=0,001).

Открихме значима корелация между стойностите на HALT-C при излекувани пациенти, APRI (r=0,723; p= 0,001) и FIB-4 (r=0,733; p=0,001).

В разработката не описахме корелациите между скоровете, които имат някоя обща променлива. На таб. 13 са показани корелациите при проследяване, като в червената гама са обратните корелации, а в синята – положителните.



Таб.13 Корелации на ниво проследяване

Установихме, че след лечение количеството на TIMP-1, α2МГ, НА в серума не се повлиява от вида ДДАС, с което е проведено лечението.

Качество на живот

Чрез анкета оценихме качеството на живота при 66 човека поне 6 месеца след края на лечението. Анкетата имаше отворени въпроси и въпроси с възможност за един верен отговор от пет. Трима пациенти

отговориха, че биха определили качеството си на живот към момента на попълването /след постигнат ТВО/ като отлично, а като не-добро 6 човека. При сравнение на здравето си преди и след лечението 47 % отговориха, че здравето им сега е много по-добро, а един човек отговори, че е много по- зле сега. Еднакъв брой пациенти посочиха, че не се е повлияло времето, което прекарват на работното си място от здравословното им състояние и няма разлика с периода преди да се лекуват. 21,7 % от пациентите не очакваха здравето им да се влоши в бъдеще, а 14,8 % очакваха здравето им да се подобри.

При отворен въпрос за настоящи заболявания, 5 човека включват в тази група и чернодробното им заболяване.

Беше зададен въпрос за сърбеж с 5 възможни отговора : 1 – нямам; 2.- през малка част от времето; 3 – през значима част от времето; 4- през повечето време; 5- през цялото време. Изходно 33,3 % са отговорили, че нямат сърбеж, срещу 59,4% при проследяване. 16,7% изходно са страдали от оплакването през значима част от времето, 50 % през малка част от времето срещу 32,8%. При проследяване се появява или се усилва сърбежът до „през повечето време“ при 7,8 %.

Установихме умерена сигнификантна корелация между оплакванията, свързани с наличието на асцит и CPS (r=548, p= 0,03) и MELD (r =0,581, p=0,008). Въпросите не корелираха помежду си.

Скор за предвиждане на смъртност

За изследването на зависимостта между типа отговор към терапията с потенциалното множество от независими фактори (предиктори) проведохме многофакторен логистичен регресионен анализ. Проведохме стъпков регресионен анализ по метода на обратната елиминация (backward), в който бяха включени потенциалното множество от независими предиктори, оценено беше и възможното взаимодействие по мултипликативната скала на независимите предиктори. При всяка стъпка несигнификантите променливи бяха елиминирани при P>0.1 от модела и при всяка следваща стъпка се -2LogLikelihood (-2LL) понижаваше. Тестът на Hosmer-Lemeshow беше несигнификантетен, което определи модела като адекватен. От потенциалното множество от независими предиктори на последна стъпка в анализа останаха следните променливи: INR, GFR, Tb, цироза от ехо и иктер.

Крайния вид на моделът (unconditional) представящ зависимостта между изчислените посредством (B) коефиценти и вероятността (P) за смърт е представен посредством логит функцията на вероятността (P):

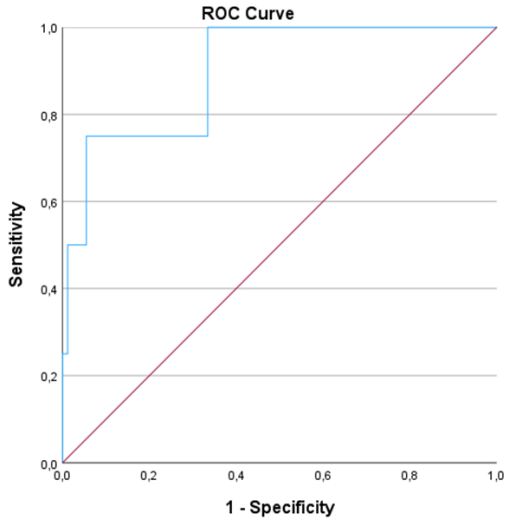
Уравнение 1) logit (P)=ln(P/1-P), Z= -19.2+2.76(Иктер „Да”)+ 16.6(Цироза „Да”)-1.7xINR-0.001xGFR-0.003xTB

Когато за определено лице, се замести стойността на INR, GFR, Tb, цироза и иктер в уравнението, от него се намира вероятността (P) то да попадне в категорията „ починал” по следната формула:

Уравнение 2) Вероятност (P)= $1/1+e^{-Z}$

ROC анализ на предсказаните от модела вероятности беше сигнификантент, p=0,006, AUC=0,9 (95% CI 0,74-1) фиг. 27, а определеният праг за P е 7%. Тоест когато се заместят стойностите в уравнения 1 и 2 за конкретен пациент се намира вероятността да е починал и ако така

изчислената вероятност е по-голяма от 7 процента. Недостатък е, че от 935 пациента много малък брой са починали, което прави модела небалансиран и логистичната регресия най-вероятно „завишава" точността на класификацията, грешка позната като „овърфитинг". Предложения за по-точна класификация е събирането на по-балансиран сет със данни, където пациентите са стратифицирани по пол и възраст и терапия и използването на логистична регресия с регуларизация на коефицентите по метода на "Elastic Net" и използване на тренировъчен и тестови сет.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s):

Area	Std. Error[a]	Asymptotic Sig.[b]	Asymptotic 95% Lower Bound	Asymptotic 95% Upper Bound
0,900	0,069	0,006	0,764	1,000

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Фиг. 26 ROC анализ на предсказаните вероятности

5. Дискусия

В настоящия труд потвърдихме диагностичната стойност на неинвазивните методи за оценка на чернодробната фиброза при пациентите с хронична HCV инфекция в българската популация, като те са достъпни, лесно репродуктивни и с голяма достоверност при разграничаване на напредналата болест от началните промени. Установихме, че към скоровете за оценка, включващи цітолитичната активност при проследяване е уместно да се използва рутинно и скор с маркер за холестатична увреда. Скоровите системи с чернодробни ензими на пръв поглед показват намаляване на стойностите основно за сметка на овладяване на цитолитичната активност, но се установи паралелно спадане на стойностите и на скоровете, в които не участват функционални чернодробни проби. В APRI, GAPRI и FIB-4 участват и тромбоцитите, които в изследваната група пациенти също показаха сигнификантно подобрение. Установихме, че стойностите на APRI и FIB-4 при проследяване намаляват в по- голяма степен при пациентите с напреднала фиброза изходно.

Достоверността на установените степени на чернодробно увреждане при използване на биологичните маркери се повишава при съчетаването им с инструментални неинвазивни методи за изследване на чернодробната плътност, каквито са TE, Strain еластография. Strain еластографията позволява оценка на чернодробното увреждане дори при пациенти с иктер, асцит, възпаление, чернодробен застой. При проследяването с инструментални методи като TE, отчитането на подобрение на фиброзата може да бъде отчетено некоректно, поради влияние на метода от ензимна активност, хранене, холестазата и застойния черен дроб. Следователно подобряването в чернодробното увреждане, след постигането на ТВО, проведено чрез неинвазивни методи на изследване подлежи на по-

нататъчна верификация, поради наличието на голям брой допълнителни фактори, отрзяващи се върху извършените измервания.

Подобно на Tsomidis и съавтори установихме по- високи нива при здрави доброволци, отколкото при пациентите с хронична HCV инфекция в серумните нива на TIMP-1. Отчетената значима динамика в стойностите на TIMP-1 при пациенти, при които е изключен паралелен процес показаха, че показателят неимоверно участва в настъпващите процеси в екстрацелуларното пространство на чернодробния паренхим. Очакваната му роля като индуктор и поддръжник на фиброзата не се оправда при изследваната от нас група пациенти, но получените резултати свидетелстват и за други обсъждани в световната литература функции – хепатопротективна и дегенеративна за патологично натрупаната съединителна тъкан. Върху динамиката на стойностите на TIMP-1 оказва влияние стойностите на креатинин (при пациенти без бъбречно заболяване), но креатининът не може да предвиди посоката на промяната, която се влияе от други фактори. Статистически значима корелация на изходните стойности на TIMP-1 с тези на пикочната киселина е слаба, при което има твърде голяма вероятност да е случайна и не е достатъчно релевантно да се включва в анализа на представената група от пациенти. В заключение различни фактори определят стойностите на TIMP-1. TIMP-1 има място в етиопатогенезата на чернодробните заболявания, но не служи като фактор за активност и напредналост на чернодробната болест. TIMP-1 може да отдиференцира здрави, неинфектирани пациенти от такива с хронична HCV инфекция, независимо от стадия на чернодробното увреждане.

Въпреки, че установихме променливи, които влияят на стойностите на TIMP-1, тяхното влияние не е определящо. В образуването и разграждането на фиброзата участват сложни имунологични процеси. Неоднозначните резултати в литературата, както и получените в настоящата разработка

говорят за дуалистична роля на маркера. Чрез серумните нива на свободна фракция на TIMP-1 ние съдим индиректно за неговата динамика в чернодробния паренхим, където той взаимодейства с различни цитокини, ензими, рецептори и други молекули.

TIMP-1 самостоятелно е с по- малка информативност, отколкото при изследване в контекста с колагеназите. Получените резултати предполагат, че все пак при голяма част от постигналите ТВО, следствие на фини имунни механизми (най- вероятно свързани с Treg) отношението MMP/TIMP-1 може да остане неблагоприятно, тоест фиброзните промени да персистират. За да се увеличи MMP/TIMP-1 отношението трябва да се получат две неща – първо да се увеличи количеството на MMP (което не е обект на настоящата дисертация) и второ да намалеят стойностите на TIMP-1, което се оказва процес, вероятно изискващ дълъг период от време. Необходими са по-задълбочени проучвания на изброените маркери, за дълъг период на проследяване, като в комбинация допълнителни маркери могат да съставят панел от лабораторни показатели, предсказващ напредналостта, възможностите за реверзибилността на патологичните процеси, не само при чернодробните заболявания Вероятно стойностите на HALT-C се определя от динамиката на TIMP-1, в по- голяма степен, отколкото от останалите съставни елементи на скора.

Нашето проучване доказа, че ролята на α-2 МГ при пациентите с излекувана HCV инфекция също с ограничена информативна стойност. Най- вероятно върху стойностите и на този маркер се отразяват антагонистични, паралелно протичащи процеса – фиброобразуване и възпаление от едната страна и възстановяване на протеосинтетичната функция - от другата. Сигнификантните разлики при портална хипертония на α-2 МГ и НА показаха за пореден път, че развитието на повишено

портално налягане е значимо събитие, което лесно може да бъде регистрирано с достъпен метод като Doppler.

Чрез анкетата за самооценка на пациентите относно качеството им на живот, беше получена обратна връзка относно реалните ефекти върху ежедневието им от лечението. Установихме положителна динамика върху самочувствието, взаимоотношението им с близките и оплакванията, които най- често се свързват с хронични чернодробни заболявания. От последните голям интерес представляваше субективното чувство за сърбеж, включено в критериите за чернодробна трансплантация. Имаше и пациенти, при които оплакванията не претърпяха значима положителна динамика, както и такива, при които се влошаваше качеството им на живот. Пациентите, при които се откриха данни сочещи към депресия се нуждаеха и от психо-емоционална подкрепа от съответните специалисти освен от стриктно проследяване на чернодробната функция.

6. Изводи

6.1 От проведените голям брой клинико- лабораторни и инструментални методи за неинвазивна оценка на чернодробното увреждане (възпаление и фиброза) се установи подобряване на степента на чернодробното увреждане при хроничен хепатит и компенсирана цироза, с изключение на HALT-C. Тази динамика най- добре се отчита при използването на GAPRI, корелиращ по – добре с APRI и FIB-4 при проследяване на пациентите с ТВО.

6.2 Стойностите на TIMP-1, α2-МГ и НА при проследяване след постигане на ТВО, показват статистически значима разлика, с покачване на TIMP-1 и α2- МГ, при спадане на НА. Корелацията между TIMP-1 и α2-МГ е по-добра при проследяване на пациентите с ТВО, отколкото изходно.

6.3 При пациентите с тенденция към спад в TIMP-1 се наблюдават по-високи стойности на AST и по – ниски стойности на албумин, по- често кървене от варици на хранопровода, отколкото при тези, при които TIMP-1 се покачва. Тези факти сочат, че при нашата група от пациенти повишаването на TIMP-1 е признак за намаляване на чернодробното увреждане.

6.4 Установи се значима разлика в стойностите на НА между пациентите без цироза и с цироза (компенсирана или декомпенсирана) преди лечението с ДДАС. Пациентите постигнали ТВО, но със по-високи стойности на AST, ALT, INR, билирубин, MELD, варици на хранопровода, при проследяване след лечение с ДДАС. показват значимо по-високи стойности на НА, тоест НА служи като индикатор персистиращо чернодробно увреждане.

6.5 α2-МГ е с по-ниски стойности при чернодробна цироза отколкото при хроничен хепатит. Алфа-2МГ не показа по-значима динамика в стойностите си при проследяване на пациентите с декомпенсирана чернодробна цироза и ТВО и не може да се използва като маркер за оценка на промени от чернодробното увреждане.

6.6 Доказа се, че TIMP-1 е маркер свързан предимно с фибринолиза, отклокото с фиброобразуване и HALT-C е подходяща скорова система за оценка на оздравителните процеси в черния дроб.

7. Приноси

7.1 Доказахме предиктивната сила на TIMP-1 за оценка на оздравителните процеси в черния дроб.

7.2 Установихме, че скоровата система HALT-C е е тази, която показва покачване на стойностите си след успешна ерадикация на HCV инфекцията.

7.3 Предложихме модел за предикция на смъртността от чернодробна болест.

7.4 Установихме, че според пациентите, асцитът определя качеството им на живот.

Публикации свързани с дисертационния труд:

Публикации в списания с ISI импакт фактор:

1. Christo Pentchev, Mariya Petkova , Victor Alargkof, Yana Boyanova, Donika Todovichin, Aneta Ivanova, Assen Aleksiev, Krasimir Antonov, Up-to-date epidemiology of chronic Hepatitits C virus infection among Bulgarian patients: A single center experience. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences. /IF: 0.329/ Под печат

Публикации в национални списания:

1. Мария Христова, Христо Пенчев, Георги Василев, Мария Петкова, Ирена Иванова, Доброслав Кюркчиев, Красимир Антонов, Атанас Кундруджиев. Асиметричен диметиларгинин - биомаркер за ренална увреда в условията на компенсирана и декомпенсирана цироза. Българска хепатогастроентерология, 2023 /под печат/
2. Петкова, М., П. Трифонов, Х.Пенчев, Е.Атанасова, Ц.Маринова, Д.Желев, К.Антонов, Лечение на хронична HCV – инфекция с комбинацията Glecaprevir/Pibrentasvir: клиничен опит. Българска хепатогастроентерология, 2022,9-12;
3. Пенчев, Х., М. Петкова, Е. Атанасова, К. Антонов, Д. Попов, Р. Николов. Нови възможности за скриниране на пациенти с хронични чернодробни заболявания за развитие на първичен чернодробен рак. GP News, 8, 2021 44-46
4. Пенчев, Х., М. Петкова, Е. Атанасова, Ц. Маринова, А. Иванова, Р. Николов, К. Антонов. Наличие на антитела срещу SARS-CoV-2 при пациенти с хронична HCV инфекция и значението им за тежестта на чернодробното увреждане. Българска хепатогастроентерология. 2020, 2:25-27

5. Пенчев, Х., М. Петкова, Д. Кръстева, Р. Томова, С. Драгнева, Цв. Маринова, Я. Боянова, Н. Желева, А. Иванова, Р. Иванова, А. Алексиев, Д. Попов, Д. Желев, К. Антонов. Ледипасвир/Софосбовир при пациенти с хроничен вирусен хепатит С – опит на един клиничен център. Българска хепатогастроентерология, 2020, 9-12;60

6. Петкова, М., Д. Кръстева, Х. Пенчев, Е. Атанасова, Ц. Маринова, К. Антонов, Д. Желев. Лечение на хронична HCV-инфекция с комбинация Софосбувир/Велпатасвир: клиничен опит. Българска хепатогастроентерология, 2020, 13-17;

7. М. Петкова ,Х.Пенчев , Е. Атанасова , Ц. Маринова , Д. Желев , К. Антонов. Първи клинични резултати от приложението на SOF/VEL/VOX (VOSEVI) при пациенти с хронична HCV – инфекция, неотговорили на предишна терапия с ДДАс, Българска хепатогастроентерология, 2020 , 13-17

8. Хр. Пенчев. Еволюция на напредналата чернодробна болест след успешна ерадикация на хронична HCV инфекция с директно действащи антивирусни средства. Българска хепатогастроентерология. 2019 1, 35 – 43.

9. М. Николова, Ат. Кундурджиев, И. Ангелова, Хр.Пенчев, С. Драгнева, П. Николов, З.Спасова, М.Рангелова, К.Давидов. Бъбречни увреждания при болести, свързани с натрупване на желязо-хемохроматоза и таласемия майор. Диагностичен и терапевтичен ултразвук, 2019,бр.2, стр.69-75.

10. Д. Кръстева, Х. Пенчев, М. Петкова, А. Иванова, А. Алексиев, Д. Попов, Р. Иванова, Д. Желев, К. Антонов. Съвременно лечение на

хроничен вирусен хепатит С в реалната клинична практика. PRO MEDIC. 2019/бр.1, стр. 54-60.

Публикации в чуждестранни списания без ISI импакт фактор:

1.Ch. Pentchev, V. Alargcof, D. Krasteva, M. Petkova, Y. Boyanova, A.Ivanova, A. Aleksiev, K. Antonov. Up-to-date epidemiology of chronic Hepatitits C virus infection among Bulgarian patients: A single center experience. World Congress of Gastroenterology Abstracts; Turk J Gastroenterol 2019; 30(3): S137-S912.

Участия в научни конгреси, конференции и симпозиуми в България и Чужбина

1. Д. Попов, Е. Атанасова, Х. Пенчев, А. Алексиев, К. Антонов, Р. Николов. Real-Time Tissue Elastography за неинвазивна оценка на фиброзата при хронични чернодробни заболявания. Българска асоциация по ултразвук в медицината. XXIII конгрес, септември 2020г.

2. Ch. Pentchev, V. Alargcof, D. Krasteva, M. Petkova, Y. Boyanova, A. Ivanova, A. Aleksiev, K. Antonov. Up-to-date epidemiology of chronic Hepatitis C virus infection among Bulgarian patients: A single center experience. World Congress of Gastroenterology, 21-24 september, 2019, Istanbul, Turkey Poster presentation.

3. Х.Пенчев, М.Петкова, Д.Кръстева, К.Антонов, А.Иванова. Хроничен вирусен хепатит С в българската популация. IV Национален конгрес за млади гастронетеролози. 23-24 март, 2018г. гр.София. **Орална презентация**

4. Х. Пенчев, К. Антонов И. Иванова Динамиката в стоймостите на тъканните инхибитори на металопротеиназите и алфа-2 макроглобулина като потенциални маркери за обратно развитие на фиброзата при напреднала чернодробна болест. Национална конференция на BGASL 2018 **Орална презентация.**

5. Ch. Pentchev, V. Alargcof, D. Krasteva, M. Petkova, Y. Boyanova, A. Ivanova, A. Aleksiev, K. Antonov. Up-to-date epidemiology of chronic Hepatitis C virus infection among Bulgarian patients: Asingle center experience. World Congress of Gastroenterology, 21-24 september, 2019, Istanbul, Turkey Poster presentation.

Участия в издадени учебници и монографии:

1. Вътрешни болести, диагноза и терапия.том.II. под ред. На Жени Милева, Гео Нешев и Александър Шинков, АРСО София 2020: Болести на храносмилателната система.

2. Гастроентерология 2020 том I. Под ред. на Захари Кръстев и Росен Николов, Зум Дизайн ООД 2020:

- Христо Пенчев. Изкуствен и биоизкуствен черен дроб.405-407

БЛАГОДАРЯ НА:

- научния ми ръководител - проф. д-р Красимир Антонов, дмн – за винаги отворената врата, за пълната свобода и за доверието.
- колегите ми от Клиника по гастроентерология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД, специално на доц. д-р Димитър Попов, дм и д-р Евелина Атанасова, дм.
- екипът на Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, с ръководител проф. д-р Доброслав Кюркчиев, дмн и специално на д-р Георги Василев.
- д-р Ирена Иванова – началник на Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“.
- д-р Мария Христова, дм , Клиника по нефрология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“.
- Димитър Райнов.