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

д-р Цветелина Димитрова Маринова

МЕТАБОЛИТНИ МАРКЕРИ НА ХРОНИЧНИТЕ ЧЕРНОДРОБНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

София, 2014 г.

Дисертационният труд е написан на 126 страници, включващи 28 таблици и 38 фигури. Библиографската справка съдържа 170 литературни източника, от които 19 български и 151 чуждестранни.

Изследванията свързани с дисертационния труд са проведени в Клиниката по гастроентерология и Лаборатория по порфирии и молекулярна диагностика на чернодробните заболявания на УМБАЛ «Св. Иван Рилски» и Лаборатория по терапевтичен лекарствен мониторинг и клинична фармакология, УМБАЛ „Александровска" София

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедра вътрешни болести при Медицински Университет-София съгласно чл. 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-София на 07.04.2014 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 19.09.2014 г. от 13 .00 ч. в аудиторията на УМБАЛ «Св. Иван Рилски», София, пред научно жури в състав:

1. проф. Захари Кръстев, дмн
2. проф. Красимир Антонов, дмн
3. проф. Людмила Матева, дмн
4. доц. Иванка Маринова, дм
5. доц. Дияна Николовска, дм

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

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

д-р Цветелина Димитрова Маринова

МЕТАБОЛИТНИ МАРКЕРИ НА ХРОНИЧНИТЕ ЧЕРНОДРОБНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

Научни ръководители
проф. д-р Людмила Матева Владимирова, дмн
проф. д-р Добрин Аврамов Свинаров, дмн

София, 2014

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Използвани съкращения ..... 4 стр.

Въведение..... 7 стр.

Цел и задачи..... 9 стр.

Материал и методи..... 11 стр.

Резултати ..... 17 стр.

Изводи..... 46 стр.

Приноси ..... 48 стр.

Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд..... 49 стр.

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

АС – алкохолна стеатоза

АСБ – алкохолна стеатозна болест

АСХ – алкохолен стеатозен хепатит

АЧБ – алкохолна чернодробна болест

ГРГ – горна референтна граница

ЕКГ - електрокардиография

ЗД – захарен диабет

ЗК - здрави контроли

ИБС – исхемична болест на сърцето

ИР – инсулинова резистентност

ИТМ – индекс на телесна маса

МС – метаболитен синдром

НАСБ – неалкохолна стеатозна болест

НАС – неалкохолна стеатоза

НАСХ – неалкохолен стеатозен хепатит

НГГ – нарушена гликемия на гладно

НГТ – нарушен (намален) глюкозен толеранс

ОГТТ – орален глюкозотолерантен тест

ПВ – протромбиново време

СЗО – Световна здравна организация

ССЗ – сърдечно-съдови заболявания

ТЖСК – тотален желязосвързващ капацитет

ЧЦ – чернодробна цироза

ХХВ – хроничен хепатит В

ХХС – хроничен хепатит С

ХЧЗ – хронични чернодробни заболявания

$25(OH)Д_2$– 25-хидрокси витамин $Д_2$

$25(OH)Д_3$– 25-хидрокси витамин $Д_3$

$1,25(OH)_2Д_3$– 1.25-дихидрокси витамин $Д_3$

На латиница:

CDT – (Carbohydrate-deficient transferrin) – въглехидратно-дефицитен трансферин

CDT% - релативен CDT

CK18 - цитокератин 18

CRP – С-реактивен протеин

DST - дисиалотрансферин

ELISA - ензим-свързан имуносорбентен анализ

HBV-DNA – хепатит В вирусна ДНК

HCV-RNA – хепатит С вирусна РНК

HDL - липопротеини с висока плътност

HDL – х- HDL- холестерол

HPLC – (High pressure liquid chromatography) - високо ефективна течна хроматография

HOMA-IR – Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance

IgG – имуноглобулин Г

LDL - липопротеини с ниска плътност

LDL-х – LDL- холестерол

Max – максимална стойност

Min – минимална стойност

Sx - стандартно отклонение

х – средна аритметична

II. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години се въведоха и се оценяват усилено различни биомаркери, част от които метаболитни, за неинвазивна диагноза на НАСХ и АСХ, стадия на фиброза, по-точно определяне на алкохолната генеза на хроничните чернодробни заболявания и тяхната диференциална диагноза, предсказване и оценка на терапевтичния отговор, особено при хроничните вирусни хепатити, НАСБ и АЧБ, и други. Два от тези метаболитни маркери са CDT и фракциите на цитокератин 18 (М65 и М30). Първият е свързан с оценка на алкохолната консумация и въздържанието от алкохол, а вторите отразяват клетъчната смърт на хепатоцитите и се предлагат като неинвазивни биомаркери за диференциране на простата стеатоза от НАСХ. Въпреки многобройните и разнообразни проучвания в тази насока резултатите остават противоречиви и все още липсват достатъчно доказателства, които да подкрепят въвеждането им в рутинната клинична практика.

Много данни се натрупаха и за значението на някои метаболитни промени, свързани с чернодробните заболявания. Най-мащабно се проучва значението на чернодробната стеатоза, особено с придружаващо хронично възпаление като допълнително голямо активно продуциращо цитокини депо към висцералната мастна тъкан. Вече е доказано, че неалкохолната чернодробната стеатоза и инсулиновата резистентност – периферна и/или чернодробна са най-важните фактори за поява или задълбочаване на МС, ЗД тип 2, ранна атеросклероза и повишена ранна сърдечно-съдова смъртност. Типичен пример за това е първичната НАСБ. Малко се знае обаче за честотата и характеристиката на метаболитните нарушения при другите чернодробни заболявания с придружаваща неалкохолна стеатоза. Най-добре проучено е значението й за еволюцията на ХХС и

терапевтичния отговор при интерферон-алфа базираното противовирусно лечение. Усилено се изучава и връзката й със ЗД и сърдечно-съдовия риск при хронична HCV инфекция. Изключително ограничени са данните за значението на стеатозата при ХХВ и ролята на метаболитните промени (затлъстяване или висцерално затлъстяване) при хронична АСБ. Голям е интересът и към двустранната връзката между дефицита на витамин Д и хроничните чернодробни заболявания. Проучванията в тази насока непрекъснато нарастват. Натрупаните данни доказват връзка между недостатъчното ниво на витамин Д, по-напредналия стадий на фиброза и намаления терапевтичен ефект на стандартната интерферон-алфа базирана противовирусна терапия при ХХС. Много въпроси относно честотата и значението на недостатъчното ниво на витамин Д при другите хронични чернодробни заболявания остават нерешени.

Първичната НАСБ, алкохол-индуцираното чернодробно заболяване и хроничните вирусни хепатити В и С съставляват над 90% от хроничните чернодробни заболявания. Обогатяването с нови знания относно оценката на нови метаболитни биомаркери и характеризиране на най-значимите от практическа гледна точка метаболитни нарушения са актуален проблем в съвременната гастроентерология.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1.Цели

Целите на настоящата работа включват: 1). Да характеризираме промените и оценим диагностичната стойност на биомаркерите CDT и фрагментите на СК18 - М65 и М30 при ХЧЗ и 2). Да оценим състоянието на витамин Д статуса при ХЧЗ и влиянието на стеатозата върху метаболитните промени, оценени чрез прости стандартни сурогатни маркери (белези на МС, HOMA-IR) при ХЧЗ (първична НАСБ, хроничен хепатит В и С и АЧБ със затлъстяване).

За изпълнение на горепосочените цели си поставихме следните задачи:

2. Задачи:

Задача 1.

Да оценим значението на CDT като сурогатен маркер за потвърждаване на алкохолна консумация или въздържание от алкохол при болни с ХЧЗ като:

- характеризираме промените в CDT при болни с алкохолна (АЧБ) и неалкохолна етиология (НАСБ, ХХС и ХХВ) с или без ЧЦ и здрави лица;
- сравним резултатите с анамнестичните данни и тези на другите стандартни индиректни биомаркери за алкохолна консумация.

Задача 2.

Да оценим значението на общата (М65) и каспаза-генерираната фракция (М30) на цитокератин 18 като неинвезивни сурогатни маркери за апоптоза/некроза и индикатори за чернодробно възпаление/фиброза с цел разграничаването на НАС от НАСХ в пилотно проучване като:

- характеризираме промените в М30 и М65 при болни с НАСБ и сравним резултатите с тези при ХХС, ХХВ и здрави лица.

Задача 3.

Да изследваме състоянието на витамин Д статуса при различни хронични чернодробни заболявания като:

- характеризираме и сравним промените в плазмените нива на витамин Д при болни с първична НАСБ, ХХС, ХХВ, АЧБ с и без ЧЦ и здрави лица.

Задача 4.

Да оценим влиянието на неалкохолната стеатоза (НАСБ като припокриващ синдром) върху метаболитните промени (белези на МС и HOMA-IR) при различни хронични чернодробни заболявания като:

- характеризираме и сравним метаболитните промени при болни с първична НАСБ, ХХС и ХХВ с и без придружаваща стеатоза, АСБ със затлъстяване или наднормено тегло и здрави лица без стеатоза.

V. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица

Анализираха се данните на общо 1629 лица, изследвани и лекувани в Клиниката по гастроентерология към УМБАЛ "Свети Иван Рилски" МУ-София за периода 2009-2014г, разделени в следните основни групи:

- I група - контролна: 241 здрави лица, скринирани за участия в клинични проучвания като здрави доброволци (154 мъже и 87 жени от 18 до 60 г., на средна възраст 42.80 ± 14.27г.: 54 % в млада възраст и 46% - на средна възраст); без анамнестични, физикални, лабораторни, серологични, ехографски и други данни за настоящи или минали заболявания на черния дроб и жлъчната система, вкл. стеатоза, ССЗ, ЗД и други значими заболявания, бременност, прием на медикаменти и токсични вещества, вкл. над 20 g за жените и над 30 g за мъжете дневно.
- II група - НАСБ: 403 болни с ехографки базирана диагноза първична НАСБ (266 мъже и 141 жени от 18 до 60 г., на средна възраст 43.99 ±11.32г.: 53 % в млада възраст и 47% - на средна възраст); хистологична диагноза - в 141 от случаите (21 НАС, 120 НАСХ, от които с фиброза 93).
- III група - АЧБ: 200 болни с АЧБ, без циротично преустройство на черния дроб, с алкохолна консумация над 20 g за жените и над 30 g за мъжете дневно (172 мъже и 28 жени, от 26 до 72 г.; средна възраст 46.44 ±10.07г.); хистологична диагноза – в 106 от случаите (35 АС, 71 АСХ).
- IV група - ХХВ: 334 болни с ХХВ (222 мъже и 112 жени от 18 до 61г.; средна възраст 42.71 ±13.92г.) с хистологично доказано заболяване без оформена чернодробна цироза с портална хипертония; 160 от болните - с хистологични белези за стеатоза.
- V група - ХХС: 366 болни с ХХС генотип 1 (165 мъже и 201 жени от 18 до 60.; средна възраст 45.93 ±14.10г.), с хистологично верифицирано

чернодробно заболяване без оформена чернодробна цироза с портална хипертония; 227 от болните - с хистологични белези за стеатоза.

- VI група - ЧЦ: 85 болни с ЧЦ (60 мъже и 25 жени от 29г до 71г.; средна възраст 52.60 ±9.58г.); 57 - с алкохолна етиология (47 мъже и 10 жени) и 28 - с неалкохолна вирусна ЧЦ; Child A – 42, B – 28 и C - 15.

Изследвани лица за CDT% - общо 328: 39 здрави контроли и 289 пациенти с чернодробно заболяване (35 АЧБ, 92 НАСБ, 38 ХХС, 39 ХХВ и 85 ЧЦ).
Изследвани лица за СК18 в серума –общо 83 за СК18-М30: 20 здрави контроли, 20 НАСБ (5 НАС, 3 стеатоза с изолирано възпаление, 12 НАСХ с фиброза F1/F2 -11 и F3/F4 -1), 22 ХХВ (F1/F2 -18 и F3/F4 - 4), 21 ХХС (F1/F2 -14 и F3/F4 -7); 41 от тях - и за СК18-М65 (болни с НАСБ и ХХС).
Изследвани лица за витамин $Д_3$ в плазма - общо 324: 36 здрави контроли, 32 АЧБ, 117 НАСБ, 32 ХХС, 36 ХХВ и 71 ЧЦ.
Всички лица с и без стеатоза от група I до V са *изследвани за метаболитни промени*.

2. Използвани методи

- анамнеза и насочена анамнеза за алкохолната консумация - вида, количеството на приемания алкохол, честотата и характера на приема;
- физикален статус, демографски данни, вкл. ИТМ, коремна обиколка, измерена през пъпа;
- 12-канален ЕКГ запис;
- абдоминална ехогрфия - конвенционално изследване и Доплерова ехография;
- лабораторни изследвания - пълна кръвна картина, чернодробни ензими-АСТ, АЛТ, ГГТ, АФ; общ и директен билирубин, общ белтък, албумин, протромбиново време/INR, aPTT, фибриноген, CRP, общо изследване на урина;

- кръвна захар и инсулин на гладно и оценка на инсулиновата резистентност (HOMA-IR);
- серумно желязо и ТЖСК;
- триглицериди, общ холестерол, заедно с HDL, LDL, VLDL;
- креатинин, урея, електролити;
- серологични маркери за HBV и HCV инфекция, а при доказана такава- Real Time PCR за определяне нивота на вирусен товар (HBV DNA, HCV RNA и генотип).
- специализирани изследвания:

1. течна хроматография – HPLC с бинарен градиент на Chromsystems за изследване на CDT% в серум;

2. ELISA метод за изследване на фракциите на СК18 в серум- М30 (Apoptosense ELISA, Peviva) и М65 (ELISA, Peviva)

3. течна хроматография с тройно квадруполна тандем мас спектрометрична детекция и изотопно разреждане (ID-LC-MS/MS) - за количествено определяне на 25(OH) витамин Д - (като сбор от 25(OH) витамин $Д_2$ и 25(OH) витамин $Д_3$).

- статистическа обработка на данните.

Определяне на CDT% се извърши на базата на формула, включваща общия трансферин и абсолютен CDT, измерени чрез течна хроматография- HPLC анализ с бинарен градиент. Разделянето на отделните компоненти на изследваните смеси става на база на времето на задържане на молекулите на мобилната фаза при преминаването им през колоната. Чрез HPLC се разделят различните фракции на CDT според броя на техните сиалови остатъци. Те се изобразяват като различни пикове на хроматограмата според ретенционните си времена. Чрез софтуер се изчислява площта под кривата под тях. За измерване на CDT се отчита асиалотрансферина, ди- и трисиалотрансферина. Стойности под 1.2% от трансферина се отчетоха

като нормални, тези между 1.2-2.5% - като индиферентни, а над 2.5 % - патологични.

ID-LC-MS/MS се използва и за определяне на плазмената концентрация 25(OH) витамин Д . Получените резултати бяха класифицирани в следните групи: дефицит – 0-24.9 nmol/l; изразена недостатъчност – 25-49.9 nmol/l; лека недостатъчност – 50-79.9 nmol/l; достатъчност – 80-200 nmol/l; токсичност – над 320 nmol/l.

Измерихме количествено нивата на общия СК18 в серума – СК18-М65 или СК65, който се освобождава при клетъчна смърт (некроза и апоптоза) и неговия каспазо- генериран компонент (СК18-М30 или СК30) с неоепитоп К18sp396, отразяващ само апоптозата. И двете молекули се изследваха чрез “sandwich” ELISA метод, при който се използват специфични антитела, разпознаващи съответните епитопи. СК 18-М65 ELISA съдържа две моноклонални миши антитела (М5 IgG2b и М6 IgG2a), които се свързват само с СК18. Резултатът е цветна реакция, чийто интензитет е пропорционален на цитокератиновата концентрация. СК18-М30 apoptosence ELISA също има две специфични моноклонални антитела (М5 и М30-сприцифичен само за неоепитопа К18sp396). Според инструкциите на производителя на китовете се приеха следните референтни стойности: СК18-М65 - средна стойност 264 U/L; 95^{ти} персентил 413 U/L, която приехме за прагово ниво (“cut off”) за М65; М30 - средна стойност 132 U/L; 95^{ти} персентил 260 U/L – прагово ниво (“cut off”) за М30. Тези стойностите са изведени на базата на изследване на шведска популация (здрави индивиди).

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 други специализирани изследвания, съвместими със съответната диагноза. При

болните с НАСБ и АСБ степента на стеатоза, възпалителна активност и стадия на фиброза оценихме по критериите на E. Brunt, 1999 г, а при болните с хроничен хепатит В и С използвахме оценката за степен на активност и стадий на фиброза по Metavir. Тежестта на чернодробната цироза оценихме по Child-Pugh класификацията.

Оценката на алкохолната консумация по анамнестични данни е извършена на базата на вида на алкохола, количеството за ден, измерено като абсолютен алкохол; характера на консумация (често, но в по-малки количества или рядко, но в по-големи количества), както и продължителността на алкохолния прием. Неалкохолна етиология на заболяването приехме при дневен прием до 20 g абсолютен алкохол за жени и до 30 g за мъже. За определяне на абсолютния алкохол използвахме следните критерии: 10 g абсолютен алкохол = 30 ml концентрат или 100 ml вино (1 чаша), или 200 ml бира (1 халба). Според алкохолната консумация, оценена в грам абсолютен алкохол дневно и времето на косумация, болните бяха разделени в 5 категории: 0 g /ден; <30 g /ден; >30 g /ден; въздържание (абстиненция) >1 месец; въздържание (абстиненция) <1 месец.

Промените в телесната маса изчислихме на базата на ИТМ според отклоненията в ИТМ по Класификацията на СЗО за телесното тегло (WHO, 1999). За диагнозата МС използвахме критериите, приети за нашта страна през 2010 год. от работна група към Българския институт "Метаболитен синдром". МС се приема при наличие на поне 3 от горепосочените 5 критерии. За оценка на промените в глюкозата и за диагнозата ЗД използвахме следните критерии: 1.Плазмена глюкоза на гладно < 5.6 mmol/l – нормална гликемия на гладно; 2. Пламена глюкоза на гладно равна или по-висока от 5.6 mmol/l и по-ниска от 7.0 mmol/l - „нарушена гликемия на гладно" (НГГ); 3. Диабет: глюкоза на гладно равна или по-висока от 7 mmol/l или глюкоза на 2-я час след орално обременяване с

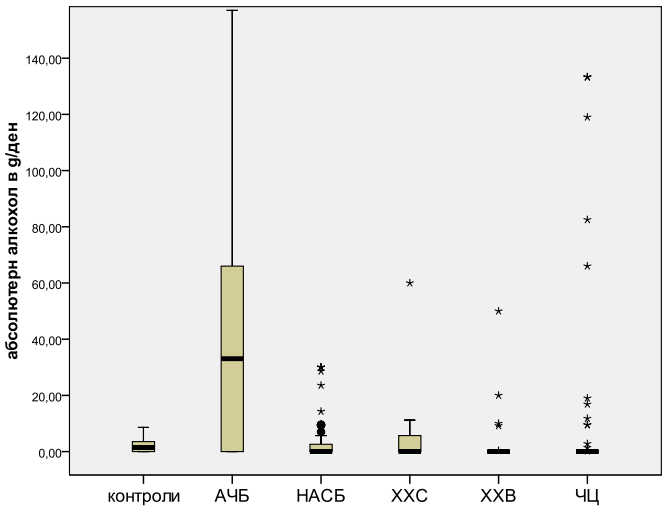
глюкоза равна или по-висока от 11.1 mmol/l. Оценката на инсулиновата резистентност извършихме на базата на определените инсулина и глюкоза на гладно. Изчислихме HOMA-IR по следната формула = Инсулин на гладно (μIU/mL, μE/mL или mU/l) x глюкоза на гладно (mmol/l) /22.5.

Използвахме следните статистически методи за оценка на достоверността на получените резултати: дескриптивна статистика; тест на Kolmogolov-Smirnov за проверка на вида на разпределние на данните в групите (Гаусово/не-Гаусово); тест на Shapiro-Wilk за проверка на вида на разпределние на данните при групи с по-малко от 50 лица; Student (t-тест) за сравняване на две независими групи данни; непараметричен тест на Mann-Whitney за сравнение на две независими групи и откриване на статически значима разлика; ANOVA; $\chi 2$; корелационен анализ- Spearman (при не-Гаусово) и Pearson (при Гауосово разпредение) и оценка на силатата на корелационните коефициенти. Получените резултати са оценени като статистически достоверни при прагово ниво на значимост $p<0.05$.

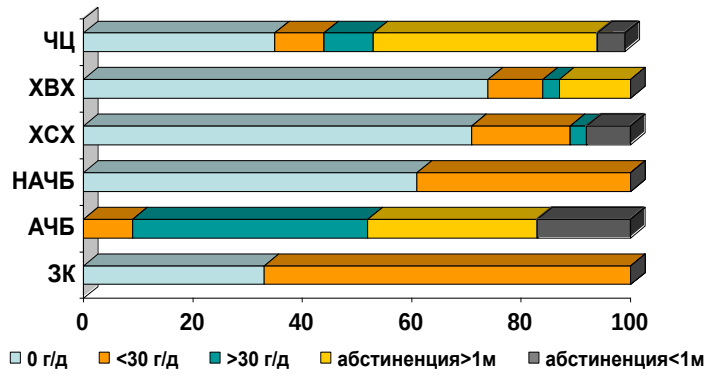
VI. РЕЗУЛТАТИ

1. Въглехидратно-дефицитен трансферин (CDT%) при ХЧЗ и значението му за определяне на алкохолна злоупотреба и въздържание от алкохол

Дневната алкохолна консумация по анамнестични данни е най-голяма в групата с алкохолна етиология (АЧБ с или без ЧЦ) в сранение с всички останали групи (p=0.0001), (фиг. 1). Анамнезата за алкохолна консумация над 30 g абсолютен алкохол дневно бе също по-честа при АЧБ с и без ЧЦ отколкото в останалите групи (p=0.0001), (фиг. 2). Абстиненция над 1 месец съобщиха 31% от пациентите с АЧБ и 42% от тези с ЧЦ, а за период под 1 месец – съответно 17% и 5% .



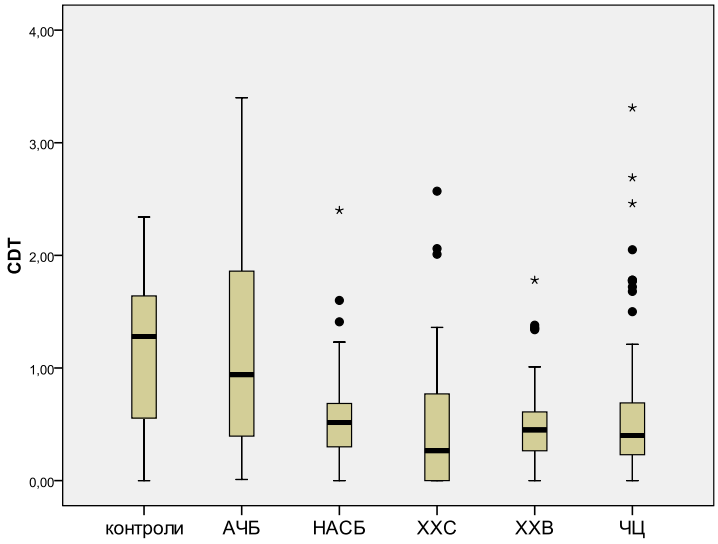
Фигура 1. Дневно количество консумиран абсолютен алкохол (g) в отделните групи изследвани лица



Фигура 2. Характеристика на алкохолната консумация по категории при всички групи изследвани лица

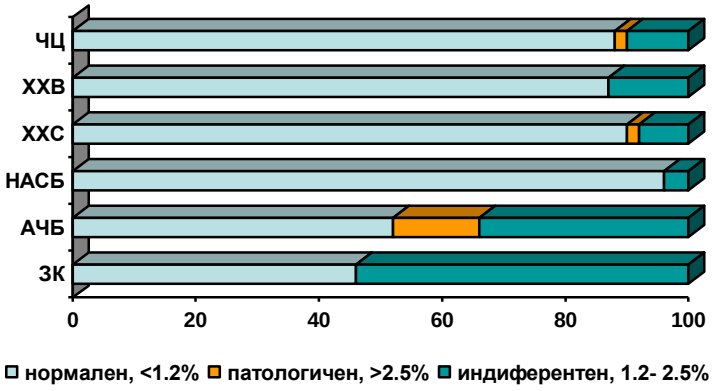
Всички контролни лица и пациентите с НАСБ не приемат абсолютен алкохол над 30 g дневно по анамнестични данни. Само 4 от болни с ХХС и 6 от тези с ХХВ са приемали (до 1 или повече от преди 1 месец) или приемат абсолютен алкохол над 30 g дневно към момента на изследването. В групата с алкохолна етиология на заболяването и тази с ЧЦ броят на прекратилите или продължаващи алкохолната консумация над 30 g абсолютен алкохол дневно е съответно 17 и 15 от 35, и 39 и 8 от 85. Така значима алкохолна консумация (над 30 g абсолютен алкохол дневно) към датата на изследването съобщават само 25 от общо 328 изследвани – 7.6 %.

При 327 изследвани от нас лица CDT% бе определен за сметка на дисиалотрансферина. Асиало- (0.1%) и моносиалотрансферин (2.26%) бяха открити само при един пациент с АЧБ с продължаваща алкохолна консумация от 133 g абсолютен алкохол дневно. При нито един от изследваните не установихме генетични варианти в молекулата на CDT.
Средните тойностите на CDT% бяха значимо по-високи в групата на АЧБ, срванени с всички останали групи (p=0.0001), (фиг. 3). Във всички групи стойностите на CDT % бяха по-високи при мъжете в сравнение с тези при жените (p=0.015-0.003).



Фигура 3. Стойности на CDT% при всички групи изследвани лица

При 18 от 39 изследвани контролни лица (46%) и при 265 от 289 пациенти с ХЧЗ (88.6%) стойностите на CDT% бяха под 1.2%, което отхвърля значима алкохолна консумация според този показател (фиг. 4). Само при 8 болни (7 с АЧБ , 2-ма от които с алкохолна ЧЦ и 1 с ХХС) - 3% установихме CDT% над 2.5%, т.е. потвърждаване на голяма алкохолна консумация. Стойности на CDT% между 1.2% и 2.5% отчетохме при 55 от всички изследвани – общо 16%: 21 от 39 здрави контроли (54%) и 34 от 289 – с ХЧЗ (46%). Най-големият дял болни с интермедиерен резултат намерихме в групата с АЧБ - 12 от 35.

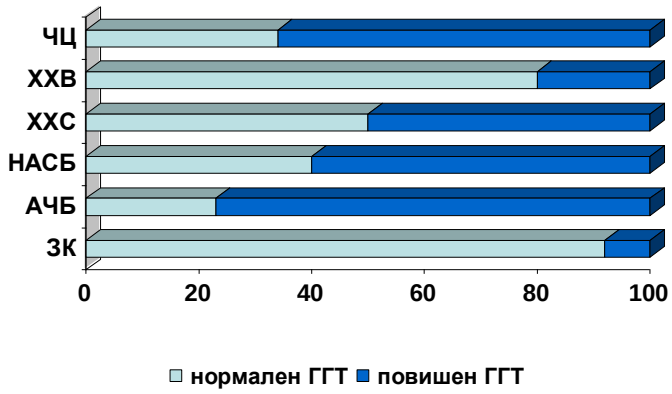


Фигура 4. Дял на промените в CDT% при всички групи изследвани лица

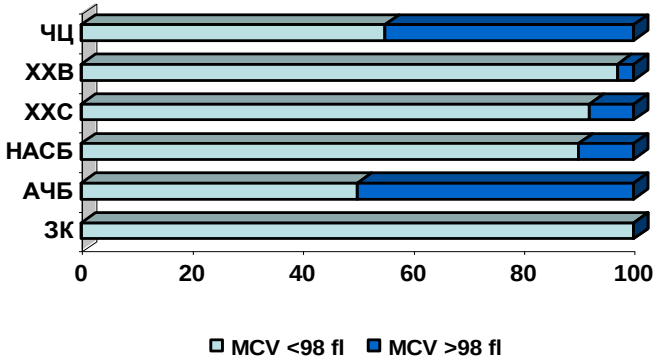
При ЧЦ не установихме разлика в стойностите на CDT% между болните с алкохолна и неалкохолна етиология, както и в дялът на промените.

Доказахме слаба корелация между CDT% и ГГТ (r =0.121, p=0.04), С-реактивния протеин (r=0.295, p=0.001), албумина (r=0.137, p=0.021) и INR/ПВ (r=0.336/0.293, p=0.03). Само при болните с ЧЦ доказахме връзка на CDT% с общи белтък (r=0.289, p=0.03).

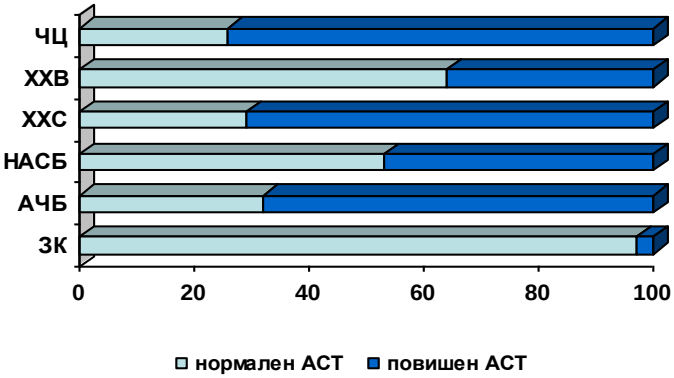
Средните стойности на всички стандартни индиректни сурогатни маркери за алкохолна консумация като ГГТ (p=0.01), MCV (p=0.05) и АСТ (p=0.001) бяха по-високи при ХЧЗ в сравнение със здравите контроли. При ХЧЗ се установи, че средните стойности на ГГТ и MCV бяха по-високи при болните с АЧБ в сравнение с останалите групи (p=0.003-0.0001), а тези на АСТ - при АЧБ в сравнение с НАСБ (p=0.006) и ХХВ (p=0.001). Дялът на повишение на ГГТ, MCV, АСТ и АСТ/АЛТ отношението показа също значима разлика между отделните групи (p=0.002 - 0.0001), (фиг. 5-8).



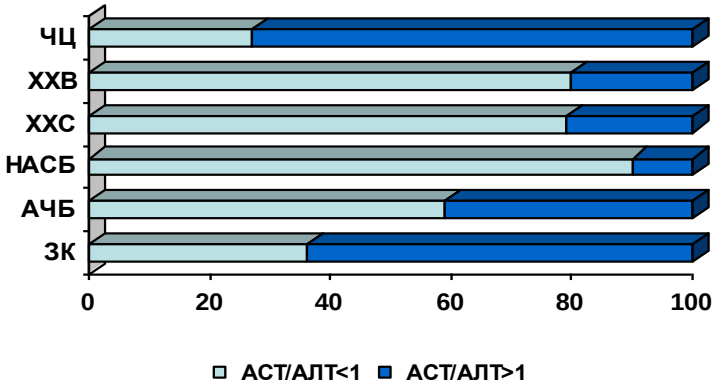
Фигура 5. Дял на повишени и нормални стойности на ГГТ при отделните групи изследвани лица



Фигура 6. Дял на повишени и нормални стойности на MCV при отделните групи изследвани лица



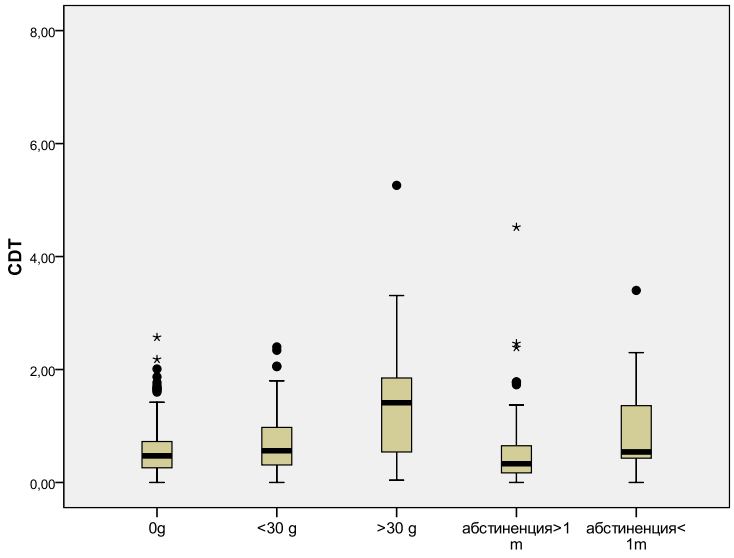
Фигура 7. Дял на повишени и нормални стойности на АСТ при отделните групи изследвани лица



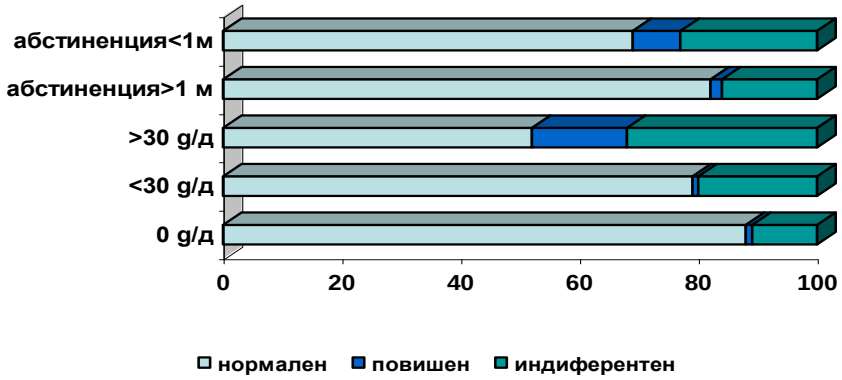
Фигура 8. Дял на отношението АСТ/АЛТ над 1 при отделните групи изследвани лица

Не установихме статистически значими разлики в средните стойности и честотата на отклонение на ГГТ, MCV и АСТ сред болните с ЧЦ с алкохолна и неалкохолна (вирусна) етиология, както и между болните с компенсирана и декомпенисирана цироза.

Потърсихме връзка между анамнестичните данни за алкохолната консумация, представени като количество приет абсолютен алкохол дневно и всички сурогатните биомаркери за алкохолна консумация. Установихме слаба, но статистически значими корелация със CDT% (r =0.185, p=0.002), ГГТ (r =0.198, p=0.001), MCV (r =0.209, p=0.001), АСАТ (r =0.153, p=0.01) и АСТ/АЛТ отношението (r=0.154, p=0.05). Най-високите стойности на CDT% установихме при прием на абсолютен алкохол над 30 g дневно в сравнение с другите категории (p=0.0001), (фиг. 9). Стойностите на CDT% при абстиненция над 1 месец са по-ниски спрямо тези при значима алкохолна и спрямо консумация на абсолютен алкохол под 30 g /ден (p=0.024). По-високо е и консумираното количество абсолютен алкохол дневно при CDT% над 2.5% и между 1.2 % и 2.5% (p=0.003), както и стойността на ГГТ при CDT% над 2.5% (p=0.019). Нормален CDT% се открива както при анамнеза за незначима алкохолна консумация, така и при болните, съобщаващи за прием на абсолютен алкохол над 30 g дневно (n=13) и тези с абстиненция под и над 1 месец (n=61), (фиг. 10).

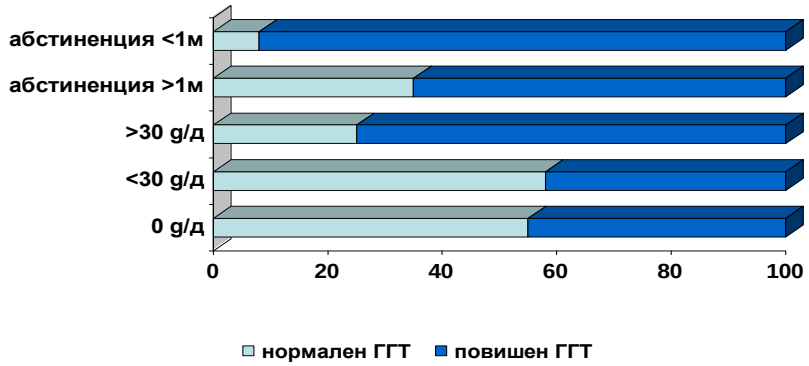


Фигура 9. Стойности на CDT% според ежедневния прием на абсолютен алкохол

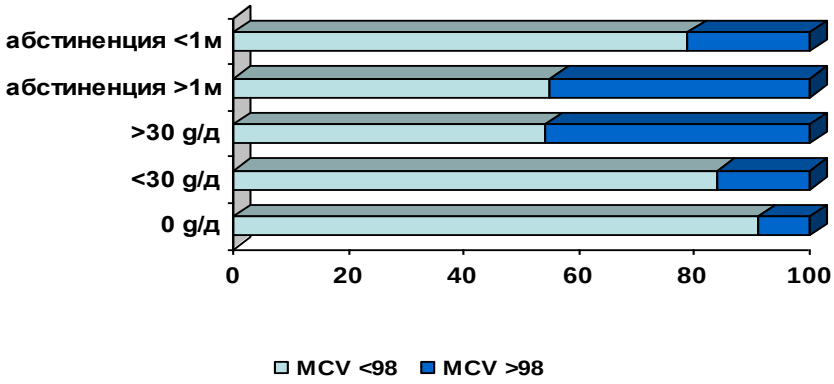


Фигура 10. Промени в стойностите на CDT% според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории

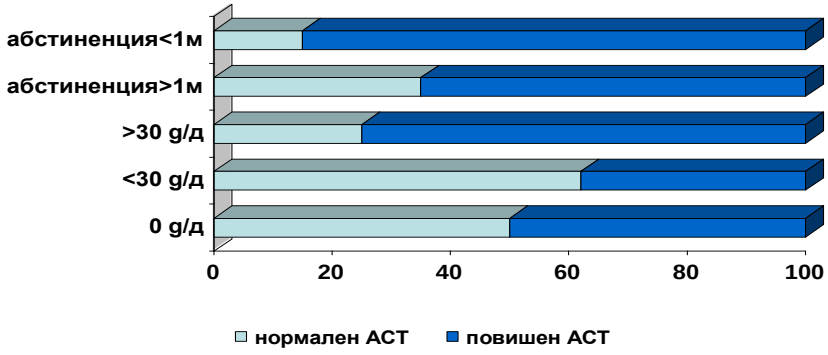
Средните стойности и дялът на повишение на стандартните индиректни маркери за алкохолна консумация ГГТ, MCV и АСТ показаха също значими разлики между отделните групи (p=0.004 - 0.0001), (фиг.11-13).



Фигура 11. Промени в стойностите на ГГТ според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории



Фигура 12. Промени в стойностите на MCV според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории



Фигура 13. Промени в стойностите на АСТ според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории

Установихме още значима слаба връзка на ГГТ с АСТ (r =0.317, p=0.001) и MCV (r =0.227, p=0.001), и между MCV и АСТ (r =0.150, p=0.011).

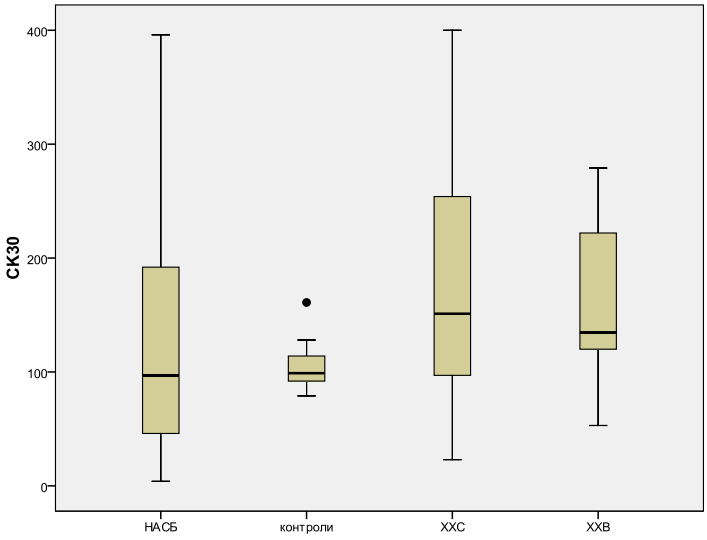
При комбиниране на показателите ГГТ, MCV и АСАТ, с или без CDT% дялът на болните със значителна алкохолна консумация и с абстиненция нараства, но без да достига необходимата чувствителност и специфичност.

2. Цитокератин 18 при ХЧЗ и значението му за оценка на клетъчната смърт

Стойности на СК18-М30 при контролни лица и ХЧЗ са представен на таблица 1 и фигура 14.

Таблица 1. Стойности на СК18-М30 при контролни лица и ХЧЗ.

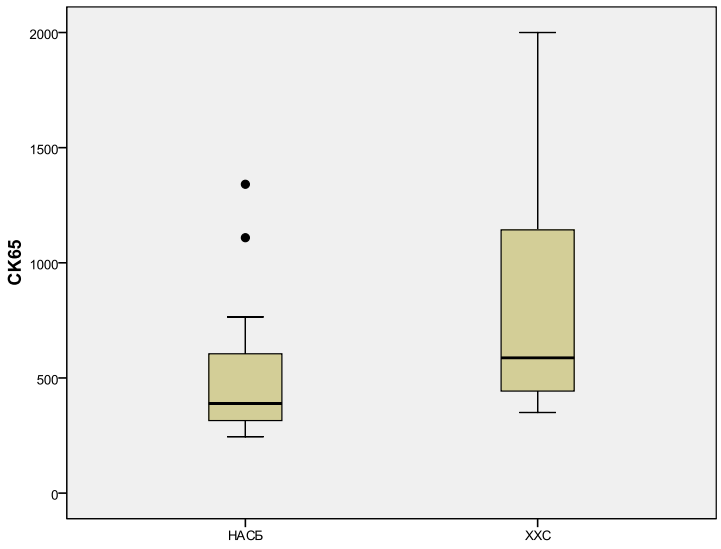
	Контроли	**ХЧЗ**
x	103,75	201,14
Медиана	99	131
Sx	18,934	229,429
Min	79	0
Max	161	1000
95^{ти} персентил	159.3	955.6



Фигура 14. Средни стойности на СК30 в групите ХЧЗ и контроли

По-високи средни стойности на СК30 отчетохме при ХЧЗ (p=0.0001), ХХС (p=0.023) и ХХВ (p=0.0001) спрямо контролите. При болните с НАСБ стойностите се движеха в широк диапазон - от 4 U/l до 1000 U/l и не показаха значима разлика с контролите. Не намерихме значима разлика и при сравнявне на резултатите между болните с НАСБ, ХХС и ХХВ. Стойности на СК30 над приетото прагово ниво от 260 U/l установихме само в 18 % от всички случаи с чернодробно заболяване – 2 НАСБ (НАСХ с фиборза), 5 ХХС и 4 ХХВ (p= 0.0045). При всички контролни здрави лица стойностите бяха под 260 U/l. Получената стойност при здравите контроли за 95th персентил бе 159.3 U/L.

По-високи стойностите на СК65 установихме при пациентите с ХХС в сравнение с тези с НАСБ (p=0.008), (фиг. 15). При 65,8% от изследваните болни (n=27) стойностите на СК65 бяха над приетото прагово ниво от 413 U/l, по-често при болните с ХХС– 18 ХХС срещу 9 НАСБ (p= 0.009).



Фигура 15. Средни стойности на СК65 при НАСБ и ХХС

Серумните нива на СК30 показаха значима, позитивна и голяма връзка със серумната активност на аминотрансферазите и ГГТ при ХЧЗ, включително в групите болни с ХХС и ХХВ, а в групата НАСБ корелация отчетохме само с АСТ и ГГТ (табл. 16 и 17). Същото се касае и за СК65 по отношение на ХЧЗ като цяло и ХХС. Този биомаекер корелираше само с АСТ при болните с НАСБ. При здравите лица СК30 показа корелация само с аминотрансферазите. В допълнение установихме и връзка между СК30 и ИТМ при ХХС, както и с глюкозата при ХХВ. Установи се още висока позитивна корелационна връзка между СК30 и вирусния товар при ХХВ ($r=0.710$, $p=0.0001$).

Таблица 16. Корелационни зависимости на СК30 и СК65 при ХЧЗ и контролни здрави лица.

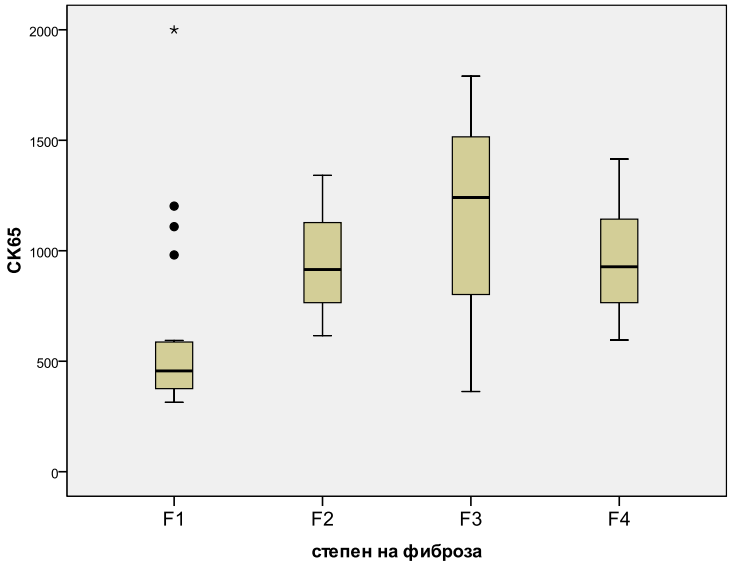
	СК30		СК65	
параметър	Корелационен коефициент	p	Корелационен коефициент	p
ХЧЗ				
АСАТ	0.491	0.0001	0.706	0.0001
АЛАТ	0.455	0.0001	0.679	0.0001
ГГТ	0.554	0.0001	0.505	0.001
ЗК				
АСАТ	0.534	0.022		
АЛАТ	0.482	0.043		

Таблица 17. Корелационни зависимости на СК30 и СК65 при ХЧЗ

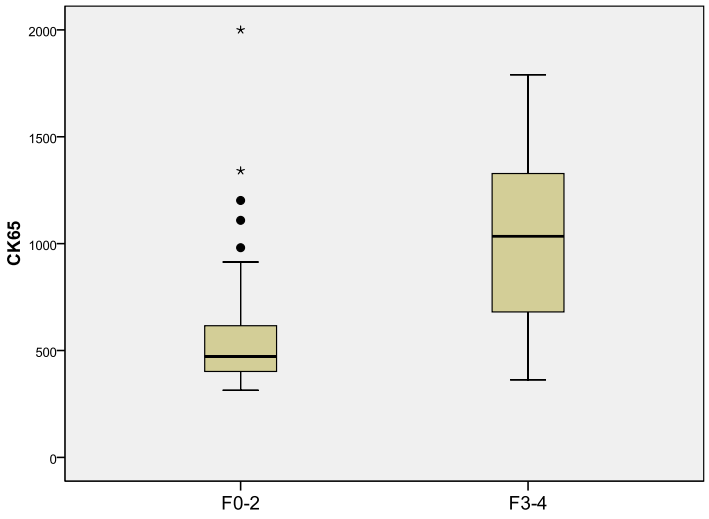
	СК30		СК65	
параметър	Корелационен коефициент	p	Корелационен коефициент	p
НАСБ				
АСАТ	0.530	0.033	0.682	0.002
ГГТ	0.508	0.031		
ХХС				
АСАТ	0.506	0.019	0.670	0.001
АЛАТ	0.658	0.001	0.772	0.001
ГГТ	0.532	0.016	0.618	0.004
ИТМ	0.460	0.048		
ХХВ				
АСАТ	0.523	0.012		
АЛАТ	0.467	0.028		
ГГТ	0.718	0.0001		
глюкоза	0.568	0.0001		

Корелационни връзки установихме за СК30 с хистологичната активност (p=0.030, r=0.293) и степента на фиброза (p=0.070, r=0.361), а за СК65 - със степента на фиброза (p=0.002, r=0.518). По-високи стойности за СК65 установихме при F2 и F4 спрямо F1 (p=0.046, p=0.010), както и при

сравняване на начална и напреднала фиброза (p=0.020), (фиг.18 а и б). Без разлика на рапределението над и под праговото ниво според стадия на фиброза.



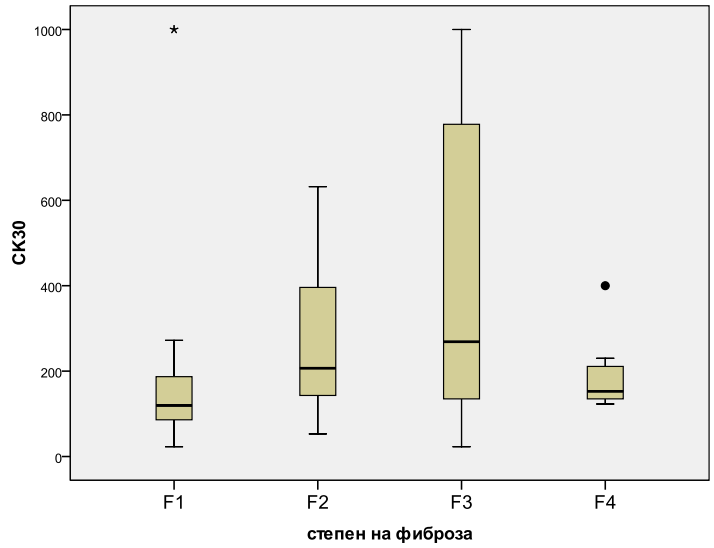
а)



б)

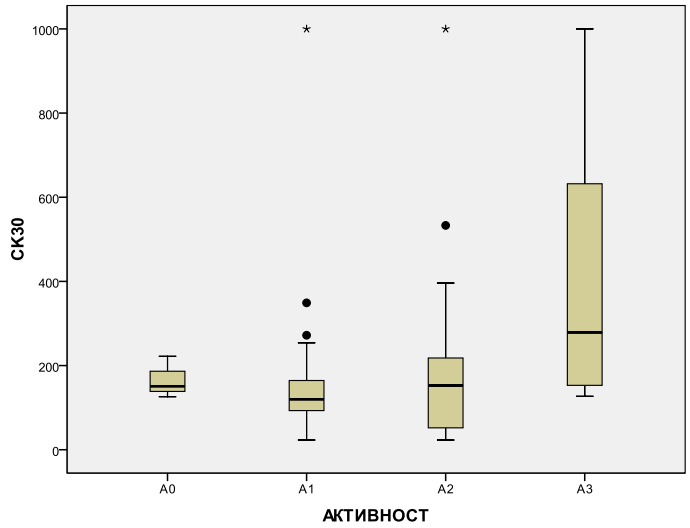
Фигура.18. Средни стойности на СК65 според стадия на фиброза при ХЧЗ (а и б)

Аналогични данни получихме за СК30 - по-високи стойности за F2 спрямо F1 (p=0.016), (фиг.19).

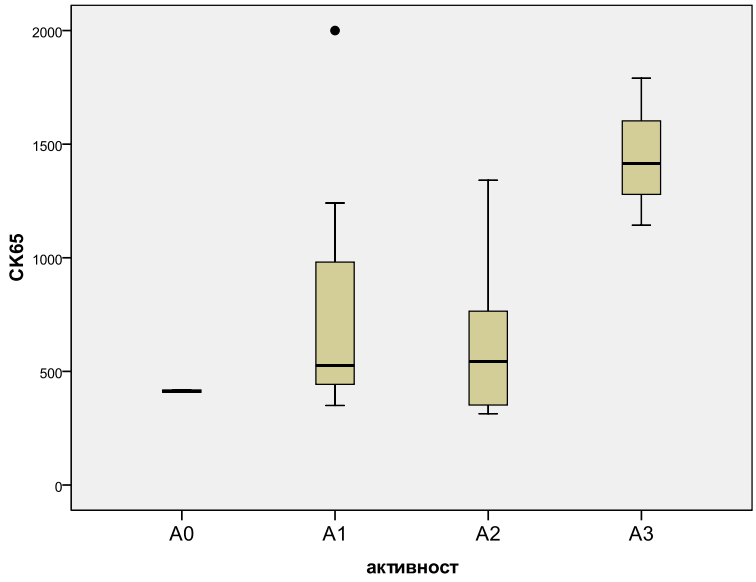


Фигура.19. Средни стойности на СК30 според стадия на фиброза при ХЧЗ

По-високо бяха стойностите на СК30 при хистологична активност А3 в сравнение с А1 и А2 при ХХВ и ХХС (p=0.030, p=0.049), както и тези на СК65 (за ХХВ - p=0.047 и за ХХС p=0.006), (фиг. 20 и 21).



Фигура.20. Средни стойности на СК30 според степента на активност при ХЧЗ



Фигура 21. Средни стойности на СК65 според степента на активност при ХЧЗ

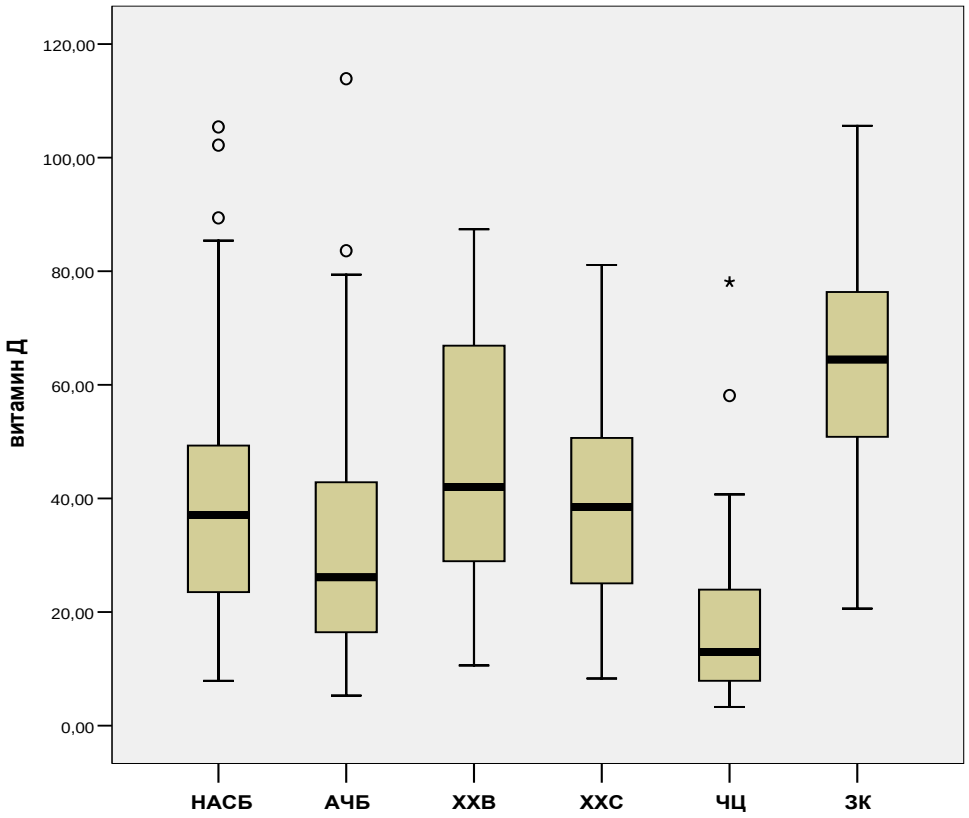
При болните с НАСБ с НАС отчетохме в 5 от 5 случая стойности на СК30 под 260 U/l, докато за СК65 установихме 2 стойности над 413 U/l и 3 под тази стойност. В случаите с граничен НАСХ (липса на достатъчно критерии за диагнозата НАСХ) СК30 бе под 260 U/l в 3 от 3 случая, а СК65 - над 413 U/l в 2 случая, а в 1 – под 413 U/l. Само в два от 12 случая с хистологично доказа НАСХ СК30 бе над 260 U/l, а СК65 над 413 U/l – в 6 случая.

3. Промени на 25(OH) витамин $Д_3$ при ХЧЗ

Изследвахме промените в плазмените нива на 25(OH) витамин Д (витамин Д) при различни ХЧЗ (n=288) и сравнихме получените резултати с тези на 36 контролни здрави лица и между изследваните групи ХЧЗ.

Допълнително се разгледаха резултатите и според две основни групи – недостатъчност (включваща дефицита, изразената и леката недостатъчност) и достатъчност. При нито един от пациентите не установихме ниво на витамин Д над 320 nmol/l.

Средните стойности на витамин Д в плазмата при контролите бяха значимо по-високи отколкото тези на ХЧЗ (p=0.0001), както и спрямо отделните групи ХЧЗ (p=0.0001) (фиг. 22). Сравняване на резултатите между групите с чернодорбни заболявания показа значима разлика само между АЧБ и ХХВ (p=0.007). Средните стойности на витамин Д бяха значимо по-ниски при болните с хистологични данни за напреднала фиброза F4 в сравнение с останалите стадии на фиброза, вкл. тези с вирусна етиология- ХХС и ХХВ (p=0.0001), (табл. 18).



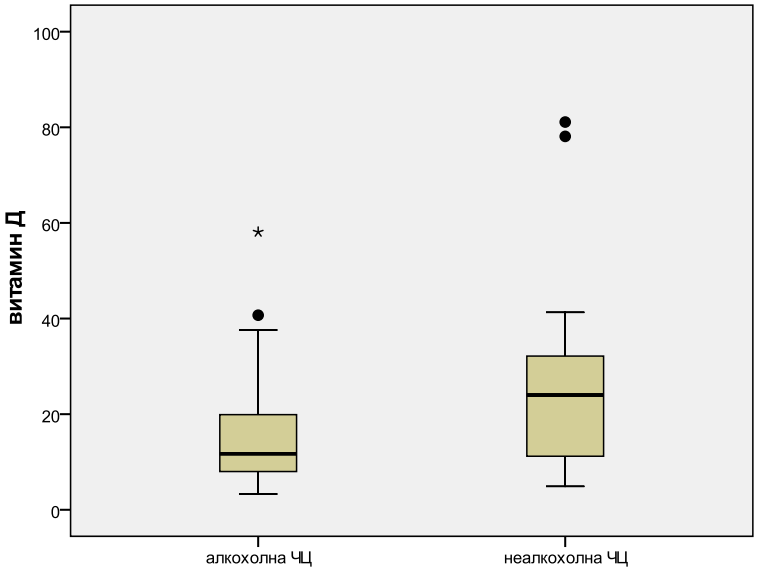
Фигура 22. Средни стойности на витамин Д в групите ХЧЗ и контроли

Таблица 18.Средни стойности на витамин Д според хистологичния стадий на фиброза при ХЧЗ.

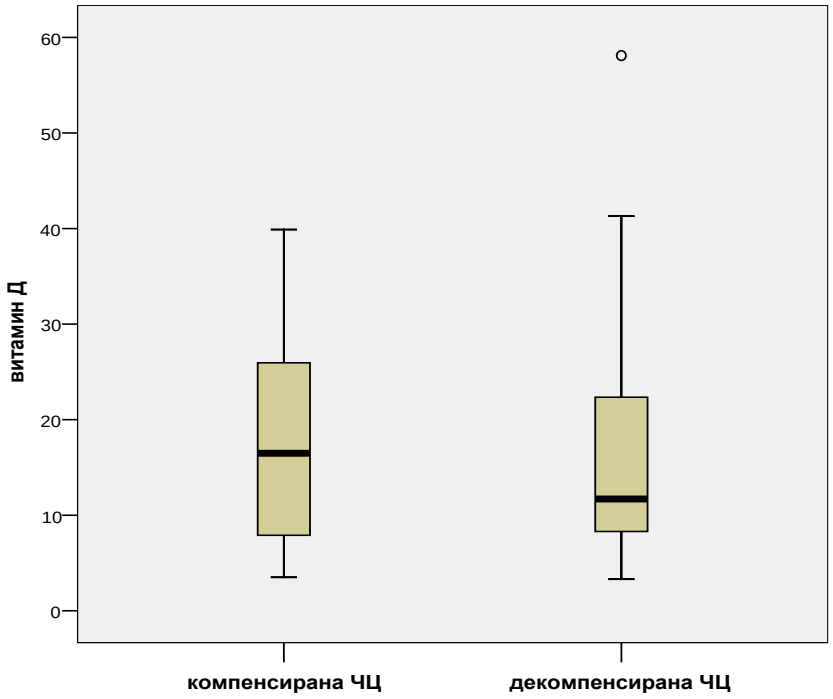
F	брой	x	Sx	Станд. грешка	Min	Max
F0	22	40,08	17,652	3,763	17,5	89,4
F1	47	43,84	22,857	3,334	10,6	105,4
F2	15	42,37	23,147	5,977	14,5	84,1
F3	13	42,98	19,686	5,460	17,9	75,8
F4	42	22,70	17,879	2,759	3,5	81,1
общо	139	36,62	22,151	1,879	3,5	105,4

Най-ниски стойности установихме при болните с ЧЦ в сравнение с болните без цироза (p=0.0001), вкл. спрямо НАСБ (p=0.0001), АЧБ (p=0.001), ХХВ (p=0.0001) и ХХС (p=0.0001), както и спрямо контролните лица (p=0.0001). По-ниски бяха и стойностите при алкохолна етиология

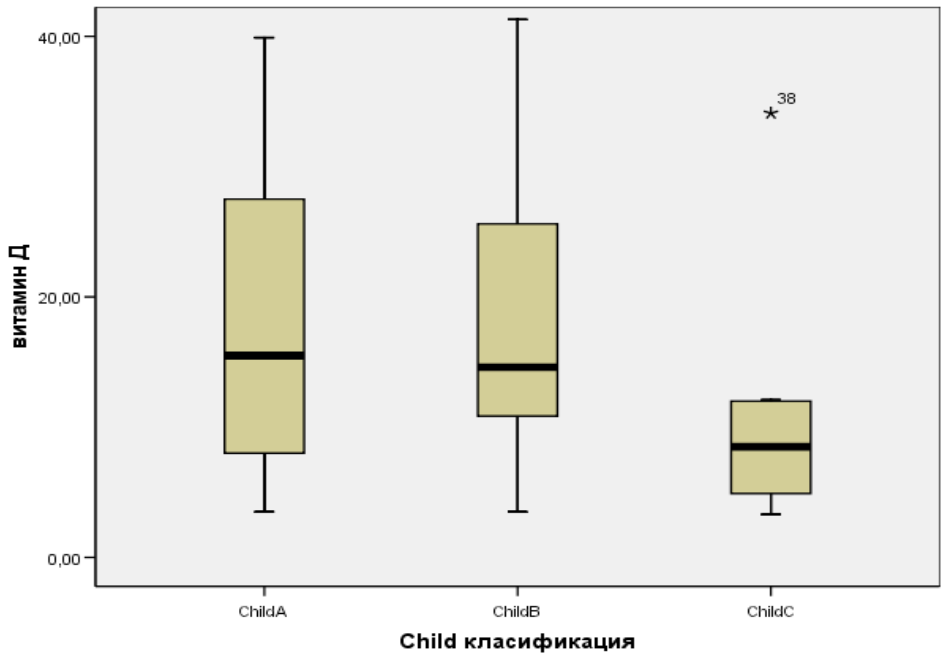
спрямо неалкохолна ЧЦ (p=0.005), при декомпенсирана срещу компенсирана ЧЦ (p=0.005), както и при болните с Child C спрямо Child B и Child A (p=0.005) , (фиг. 23- а, б, в).



а)



б)



в)

Фигура 23. Средни стойности на витамин Д при пациентите с ЧЦ (а, б, в)

Повечето от изследваните болни с ХЧЗ са с различна степен на недостатъчност (от дефицит до недостатъност) на витамин Д - 96,5% (табл. 19). Здравите контроли показаха по-рядко от ХЧЗ недостатъчност - в 77.8% (p=0.005), (p=0.0001). В контролната група най-често набюдавахме лека недостатъчност, докато при болните с ХЧЗ отчетохме еднакъв дял на пациентите с дефицит и изразена недостатъчност (p=0.0001), (табл. 20).

Таблица 19. Промени в плазмените нива на витамин Д по категории при висчки изследвани лица.

Група	**Недостатъчност**	**Достатъчност**	**Общо**
ХЧЗ - n (%)	278 (96,5)	10 (3,5)	288 (100)
Контроли - n (%)	28 (77,8)	8 (22,2)	36 (100)
Общо -n (%)	306 (94,4)	18 (5,6)	324 (100)

Таблица 20. Промени в плазмените нива на витамин Д по степен на дефицит при пациентите с ХЧЗ и здрави контроли.

Дефицит/токсичност	**ХЧЗ** (n=288)	**Контроли** (n=36)	**Общо** (n=324)
Дефицит – n (%)	113 (39,1)	1 (2,8)	114 (35.2)
Изразена недостатъчност – n (%)	118 (40,9)	6 (16,7)	124 (38,3)
Лека недостатъчност – n (%)	47 (16,5)	21 (58,3)	68 (21,0)
Достатъчност – n (%)	10 (3,5)	8 (22,2)	18 (5.5)

Честотата на недостатъчност при болните с ХЧЗ без цироза бе приблизително еднаква- от 89% до 97% (табл. 21). Всички болни с чернодорбна цироза показаха недостатъчност в 100%, значимо по-често от останалите (p=0.0001).

Таблица 21. Промени в плазмените нива на витамин Д по категории в отделните групи болни с ХЧЗ и контроли.

Група	**Недостатъчност**	**Достатъчност**	**Общо**
НАСБ – n (%)	114 (**97,4)**	3 (2.6)	117 (100)
АЧБ – n (%)	30 (**93,7)**	2 (6,3)	32 (100)
ХХС – n (%)	31 (**96,9)**	1 (3,1)	32 (100)
ХХВ – n (%)	32 (**88,9)**	4 (11.1)	36 (100)
ЧЦ – n (%)	71 (100)	0 (0)	71 (100)
Контроли – n (%)	28 (77,8)	8 (22,2)	36 (100)

При болните НАСБ, ХХВ и ХХС най-често установихме изразена недостатъчност, последвана с относително еднакви дялове на дефицит и лека недостатъчност (табл. 22). При АЧБ преобладаващ се установи дефицитът, последван от изразена и лека недостатъчност. В групата болни с ЧЦ наблюдавахме най-изразено намаляване на вит Д- 78.1% от всички изследвани (p=0.0001).

Таблица 22. Промени в плазмените нива на витамин Д по степен на дефицит в групите с отделни ХЧЗ и контроли.

Степени на дефицит/токсичност	**НАСБ (n=117)**	**АЧБ (n=32)**	**ХХС (n=32)**	**ХХВ (n=36)**	**ЧЦ (n=71)**	**Контроли (n=36)**
Дефицит –– n (%)	32 (27,3)	14 (43,7)	8 (25)	4 (11.1)	55 (77,5)	1 (2,8)
Изразена недестатъчност – n (%)	58 (49.5)	12 (37,5)	15 (46,8)	19 (52,8)	14 (19,8)	6 (16,7)
Лека недостатъчност- n (%)	24 (20,5)	4 (12,5)	8 (25)	9 (25)	2 (2,7)	2 (58,3)
Достатъчност – n (%)	3 (2,7)	2 (6.25)	1 (3,2)	4 (11,1)	0 (0)	8 (22,2)

При болните с ЧЦ недостатъчността и степнета на нейната изразеност са в еднакъв дял при болните с алкохолна и неалкохолна етиология, при болните с компенсирана и декомпенсирана чернодорбна цироза, както и по Child класификацията. Когато разгледахме степента на недостатчъност вътре в групата компенисарана/декомпенсирана ЧЦ установихме основно дефицит и изразена недостатъчност, с равно разпределние. Аналогични данни намерихме и за лицата с неалкохолна цироза. При ЧЦ с алкохолна етиолигия преобладаваше дефицит на витамин Д - 72.1% (p=0.005). Предимно дефицит установихме и в трите групи цирози според Child класификацията.

Оценихме влиянието на възрастта и пола. Средните стойности на витамин Д бяха значимо по-ниски при болните с ХЧЗ над 45 г (p=0.020). В групата

на мъжете над 45г също установихме по-ниски стойности спрямо мъжете под 45г (p=0.035). Подобни бяха промените и при жените. Тези под 45г също имаха по-ниски стойности спрямо жените над 45г (p=0.030). По отношение на недостатъчност/достатъчност не установихме разлика.

Дяловово разпределние на промените и средните стойности не показаха значими промени в групите според пола при ХЧЗ и при здрави лица, вкл. между млади жени и мъже (<45г), както и между жените и мъжете над 45г.

Дяловово разпределние на промените в отделните категории и средните стойности не показаха значими промени и в групите според ИТМ, наличието или липса на артериална хипертония при ХЧЗ и здрави лица. По-високи стойности установихме при лицата без ЗД (n=256) в сравнение с болните със ЗД (n=53, p=0.023), но без разлика в дялово рапределение.

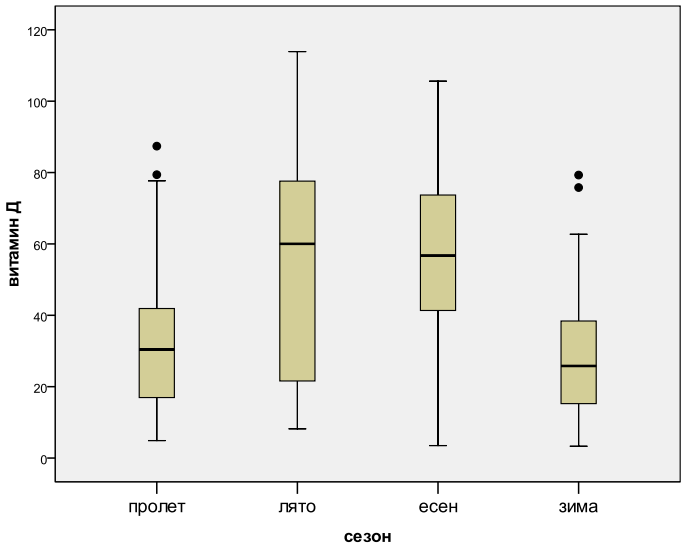
Плазмените нива на витамин Д при ХЧЗ показаха редица корелационни зависимости (табл. 23). При здравите лица установихме обратна зависимост с възрастта (корелационне коефициент -0.336, p= 0.045) и стойностите на LDL- холестерола (-0.362, p- 0.049).

Таблица 23. Корелацони зависимости на плазмените нива на витамин Д при болните с ХЧЗ.

параметър	Корелационен коефициент	p
ХЧЗ		
ГГТ	-0.166	0.006
АФ	-0.245	0.0001
ПВ	-0.333	0.0001
албумин	0.361	0.0001
общ билирубин	-0.178	0.004
директен билирубин	-0.187	0.004
CRP	-0.190	0.032
LDL-х	0.197	0.022
възраст	-0.153	0.011
Child скор	-0.253	0.026

По-ниски стойности на витамин Д установихме при лицата с понижен албумин в сравнение с лицата с нормален (p=0.001), както и при тези с повишена серумна активност на АСТ (p=0.001). От дяловото разпределние дефицитът при болните с повишени ензими достигна до 70% спрямо 30 % - при тези с нормални.

Плазмените нива на витамин Д бяха изследвани през всички сезони и показха сезонни колебания (фиг. 24). Няма разлика в дяла на изследваните болни с различни ХЧЗ през лятото и есента срещу зимата и пролетта. За разлика от контролите, при които повечето изследвания са през лятото и есента. Това трябва да се има в предвид при интерпретацията на резултатите.



Фигура 24. Сезонни промени при изследваните лица

Нивото на витамин Д при ХЧЗ без оформена ЧЦ е най-ниско през зимата, последвано от пролетта, в сравнение с лятото и есената – НАСБ (p=0.0001), АЧБ (p=0.019), ХХС (p=0.019), ХХВ (p=0.040). При болни с ЧЦ липсват значими сезонни колебания (p= 0.062), (табл. 24).

Таблица 24. Сезонни колебания на витамин Д при болните с ХЧЗ.

Група	сезон	брой	x	Sx	Станд. грешка	Min	Max
НАСБ (n=117)	зима	30	31,0	15,705	2,867	8,3	79,3
	пролет	60	34,8	14,817	1,913	7,9	77,7
	лято	13	63,0	23,509	6,520	15,7	105,4
	есен	14	58,0	23,883	6,624	22,4	102,2
АЧБ (n=32)	зима	7	27,0	16,901	6,900	11,1	55,0
	пролет	17	26,9	18,168	4,406	5,3	79,4
	лято	6	61,6	34,701	14,166	20,2	113,9
	есен	2	23,8	.	.	23,8	23,8
ЧЦ (n=71)	зима	31	16,1	11,107	1,995	3,3	39,9
	пролет	21	13,0	7,199	1,571	4,9	32,7
	лято	13	25,7	22,038	6,362	8,2	78,1
	есен	6	20,0	15,275	6,831	3,5	37,6
ХХС (n=32)	зима	13	36,1	12,636	3,505	14,0	51,9
	пролет	15	35,8	15,172	3,917	8,3	61,0
	лято	2	75,8	7,495	5,300	70,5	81,1
	есен	2	46,6	46,881	33,150	13,4	79,7
ХХВ (n=36)	зима	11	36,5	18,296	5,516	10,6	75,8
	пролет	15	46,2	20,777	5,365	18,3	87,4
	лято	7	66,3	21,829	8,250	26,8	84,1
	есен	3	44,2	21,535	12,433	19,3	56,7
контроли (n=36)	лято	5	64,2	27,669	12,374	20,6	88,0
	есен	31	64,0	17,199	3,089	28,6	105,6

4. Сравнителна характеристика на метаболитните промени при ХЧЗ със и без стеатоза и контролна група здрави лица без стеатоза

Добре известни са метаболитните отклонения – МС, ЗД и инсулиновата резистентност при неалкохолната стеатозна болест (НАСБ). С изключение на ХХС, малко се знае за метаболитната стеатоза като придружаващо състояние и свързаните с нея метаболитни промени при ХХВ и АЧБ (АСБ) със затлъстяване. Досега липсват сравнителни проучвания за честотата и характеристиката на метаболитните промени при ХХС и ХХВ със стеатоза, АСБ у лица със затлъстяване спрямо НАСБ и здравите лица без стеатоза.

В тази връзка ние оценихме честотата и характеристиката на белезите на МС, инсулина на гладно и HOMA-IR при хроничен хепатит В (n=334) и С генотип 1 (n=366) с и без неалкохолна стеатоза, НАСБ (n=403), АСБ със затлъстяване или наднормено тегло (n=200) и здрави лица без стеатоза (n=241) и сравнихме получените резултати.

Като цяло честотата на метаболитните отклонения при болните със стеатоза (ХХВ и С, НАСБ и АСБ) спрямо тези без стеатоза (вирусни хепатити С и В, и здрави контроли) беше значимо по-висока (p=0.0001), (табл. 25, 26). Изключение прявят само общия холестерол и LDL-х при ХХС с придружаваща стеатоза.

Таблица.25. Честота на метаболитни промени при болни с ХХВ и ХХС с и без стеатоза.

Метаболитни промени	**ХХВ (n=334)**			**ХХС (n=174)**		
	Общо (n=334)	Със стеатоза (n=160)	Без стеатоза (n=174)	Общо (n=366)	Със стеатоза (n=227)	Без стеатоза (n=139)
Затлъстяване	19%	38%	0.6%	21%	33%	1%
Наднормено тегло	22%	40%	6%	33%	44%	15%
Метаболитен синдром	40%	33%	2%	31%	48%	3%
Абдоминално затлъстяване	40%	78%	6%	54%	80%	12%
АХ	17%	32%	3%	22%	32%	4%
Повишен общ холестерол	22%	39%	6%	14%	19%	7%
Намален HDL-х	14%	28%	2%	20%	28%	7%
Повишен LDL-х	17%	26%	8%	16%	14%	20%
Повишени триглицериди	28%	51%	7%	17%	22%	8%
Глюкоза на гладно > 5.6 mmol/l	22%	36%	9%	32%	42%	16%
ЗД тип 2	11%	18%	4%	16%	20%	6%
HOMA-IR>2	40%	76%	7%	58%	86%	13%

Таблица. 26. Честота на метаболитни промени при болни с НАСБ, АСБ и здрави лица без стеатоза.

Метаболитни промени	**НАСБ (n=403)**	**АСБ (n=200)**	**ЗК (n=241)**
Затлъстяване	50%	60%	6%
Наднормено тегло	40%	40%	20%
Метаболитен синдром	46%	42%	12%
Абдоминално затлъстяване	91%	76%	31%
АХ	59%	52%	17%
Повишен общ холестерол	59%	58%	12%
Намален HDL-х	41%	44%	10%
Повишен LDL-х	47%	44%	23%
Повишени триглицериди	53%	60%	10%
Глюкоза на гладно > 5.6 mmol/l	46%	46%	15%
ЗД тип 2	19%	22%	Изключващ критерий
HOMA-IR>2	82%	48%	19%

Липсваше съществена разлика между двете групи болни с хроничен вирусен хепатит В и С по отношение на дялът на болните с нормална телесна маса, наднормено тегло и затлъстяване. Най-често бе затлъстяването (в половината от изследваните) при пациентите с НАСБ, докато честотата при контролите бе 6% (p=0.0001). Значимо по-често бе то и в сравнение с пациентите с ХХС и ХХВ със стеатоза (p=0.03). Всички болни със стеатоза имаха сходна честота на наднормено тегло. Средната стойност на ИТМ (kg/m²) бе съответно 25.90±3.52 за ХХВ, 25.54±3.33 за ХХС, 25.32±3.83 и -23,45±3.46 kg/m² за ЗК, значимо по-ниски от тази при НАСБ - 30,09± 4.78 kg/m² (p=0.0001).

Липсваше съществена разлика в честотата на метаболитния синдром между болните със стеатоза. Абдоминалното затлъстяване бе най-често при НАСБ, но без статистическа разлика с останалите групи. Установихме

по-висока честота на отклонения по отношение на следните показатели: АХ - при НАСБ и АСБ спрямо хронични вирусни хепатити със стеатоза (p=0.001); повишен общ холестерол – при НАСБ и АСБ спрямо ХХВ (p=0.001) и ХХС (p=0.0001) със стеатоза; повишен LDL-х – при НАСБ и АСХ спрямо ХХВ и ХХС със стеатоза (p=0.0001); намален HDL-х – при НАСБ и АСБ спрямо ХХВ и ХХС със стеатоза (p=0.04); повишени триглицериди - при АСБ и НАСБ (p=0.0001), както и ХХВ (p=0.01) спрямо ХХС. Честотата на НГГ и ЗД не се различаваше съществено между отделните групи болните със стеатоза, но тази на повишен HOMA-IR индекса бе по-ниска при АСБ в сравнение с останалите групи болни със стеатоза (p=0.01).

При болните с НАСБ и АСБ средните стойности на общия холестерол (p<0.0001), LDL –х (p<0.0001) и триглицеридите (p<0.0001) бяха по-високи от тези на здравите лица без стеатоза, а на HDL-х – по ниски (p<0.0001 и 0.02), (табл. 27 и 28). Статистически значими бяха и разликите при болните с ХХВ и ХХС със стеатоза спрямо контролите, съответно за общия холестерол (p<0.001), LDL –х (p<0.001), HDL-х (p<0.05) и триглицеридите (p<0.001 и 0.05). Подобни бяха и разликите между болните с ХХВ и ХХС с и без придружаваща стеатоза, съответно за общия холестерол (p<0.001), LDL –х (p<0.001), HDL-х (p<0.05), и триглицеридите ХХВ (p<0.0001). Стойностите на общия холестерол бяха по-високи при НАСБ и АСБ спрямо болните с ХХВ (p<0.001) и ХХС (p<0.0001) със стеатоза; на LDL –х при НАСБ и АСБ спрямо ХХВ и ХХС със стеатоза (p<0.001); на триглицеридите – при НАСБ, АСБ и ХХВ спрямо ХХС със стеатоза (p<0.001)

Средните стойности на глюкозата, инсулина и HOMA-IR при всички болните със стеатоза (НАСБ, АСБ, ХХС и ХХВ) бяха по-високи от тези на контролите и хроничен вирусен хепатит В и С без стеатоза (p<0.0001,, p<0.001 при ХХВ за инсулина). Най-ниски стойности на инсулин и HOMA-

IR установихме при АСХ спрямо всички останали групи със стеатоза ($p<0.0001$- 0.001).

Таблица 27. Средните стойности (x±SD) на липидите (mmol/l), глюкозата (mmol/l), инсулина на гладно (μIU/ml) при болни с ХХВ и ХХС с и без стеатоза.

Метаболитни промени	**ХХВ (n=334)**		**ХХС (n=366)**	
	Със стеатоза (n=160)	Без стеатоза (n=174)	Със стеатоза (n=227)	Без стеатоза (n=139)
Общ холестерол	5.24 ±1.24	4.74 ±1.00	5.05±1.62	4.52±1,23
LDL-х	2.98 ± 0.84	2.53 ± 0.82	2.72 ± 0.57	2.40 ± 0.62
HDL-х	1.31 ± 0.41	1.39 ± 0.34	1.30 ± 0.50	1.38 ± 0.49
Триглицериди	2.28± 1.42	1.02± 0.40	2.04 ± 0.93	0.98± 1.22
Глюкоза на гладно	5,59±1,10	4,77±0,82	5.78±1.72	4,82±1,00
Инсулин на гладно	16.40±10.2	13.22±4.37	22.62±12.27	13.05±4.24
HOMA-IR	4.32 ±2.29	1.43±1.87	4.88±3.25	1.92±1.34

Таблица 28.Средните стойности (x±SD) на липидите (mmol/l), глюкозата (mmol/l), инсулина на гладно (μIU/ml) при НАСБ, АСБ и здрави лица без стеатоза.

Метаболитни промени	**НАСБ (n=403)**	**АСБ (n=200)**	**ЗК (n=241)**
Общ холестерол	5,75±1,30	5. 66 ±1,61	4.83±0,88
LDL-х	3.42±1.12	3.63±1.18	2,76± 0.88
HDL-х	1,26±0.34	1.32±0.24	1.39±0.35
Триглицериди	2,35± 2.44	2.57± 2.07	1.03± 0.61
Глюкоза на гладно	5.82± 0.61	6.02 ± 2.02	5.15 ± 0.52
Инсулин на гладно	17.72 ± 11.42	10.52± 8.11	7.31 ± 2.46
HOMA-IR	4.50 ± 3.11	2.8± 1.65	1.66± 2.93

VI. ИЗВОДИ

1. Стойностите на CDT%, определени с HPLC, са увеличени при алкохолна чернодробна болест, но предимно за сметка на резултатите между 1.2 % (отхвърлящи значима алкохолна коснумация) и 2.5%. Стойност над 2.5% не потвърждава значима алкохолна консумация при доказано алкохолно чернодробно заболяване и анамнестични данни за това. CDT корелира слабо със стандартните неспецифични биомаркери за алкохол, CRP и параметрите, отразяващи белтъчно-синтезната функция на черния дроб. Комбинирането му с ГГТ, MCV, АСТ и АСТ/АЛТ отношението не увеличава диагностичната му стойност.

2. Серумните нива на СК18–М30, определени с имуноензимен метод, са повишени при хроничен хепатит В и С в сравнение със здрави лица, а М65 – при ХХС в сравнение с НАСБ. Отразяват хистологичната активност и по-напреднала фиброза и показват висока корелация с аминотрансферазите. Не отдиференцират НАС от НАСХ при прагова стойност над 260 U/l за М30 и на 413 U/l за М65.

3. Плазмените нива на 25(OH) витамин Д, определени чрез ID-LC-MS/MS, са по-ниски при хроничните чернодорбни заболявания, включващи неалкохолна стеатозна болест, алкохолна чернодробна болест и хроничен хепатит В и С в сравнение със здрави лица. Както при тях, така и при здравите лица дялът на недостатъчност е много висок и достига 100% при чернодробна цироза. Най-висок е и дялът на дефицит при чернодробна цироза. Промените зависят от тежестта на чернодробното забоялване. В стадий на цироза значението на етиологията и сезонните колебания се заличава.

4. По-висока е честотата и степента на отклонение на белезите на метаболитния синдром, захарния диабет и сурогатния маркер за инсулинова резистентност HOMA-IR, не само при болните с първична, но и при тези с придружаваща стеатоза в сравнение с лицата без стеатоза. При общо затлъстяване или наднормено тегло алкохолната стеатозна болест доближава метаболитните промени до тези на неалкохолна стеатозна болест. Двете заболявания са свързани с по-тежки отклонения в сравнение с придружаващата стеатоза при хроничен хепатит В и С. Общия холестерол и LDL-холестерола са най-ниски при хроничен хепатит С със стеатоза., а HOMA-IR - при алкохолна стеатозна болест.

VII. ПРИНОСИ

1. Характеризирани са промените в CDT% при различни ХЧЗ с алкохолна и нелакохолна етиология и различна тежест на чернодорбното увреждане. Отхвърлено е диагностичното му значение за потвърждаване на значима алкхолна консуамция и въздържание от алкохол при българските пациенти с ХЧЗ

2. Характеризирани са и са сравнени промените в серумните нива на СК18 М30 и М65 при малък брой болни с НАСБ, ХХ В и С и здрави лица. Доказана е връзката им с хистологичната активност и стадий на фиброза. Отхвърлено е значението им за отдиференциране на НАС от НАСХ при прагова стойност над 260 U/l за М30 и на 413 U/l за М65.

3. Извършен е сравнителен анализ на промените в плазмените нива на 25(ОН) витамин $Д_3$ при най-честите чернодробни забоялвания с и без цироза и здрави лица. Доказано е самостоятелното значение на по-тежкото чернодробно увреждане, свързано с по-голяма честотта и по-тежки промени.

4. Извършен е сравнителен анализ на честота и степента на отклонение на компонентите на МС, ЗД и HOMA-IR при голям брой болни с най-честите ХЧЗ (НАСБ, АСБ, ХХ В и С с и без стеатоза) и здрави лица без стеатоза. Доказани са степенни различия между болните с първична и придружаваща стеатоза, както и някои етиологични особености.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списък на научните публикации във връзка с дисертацията

1. Пенкова М, С. Драгнева, **Ц. Маринова**, Р. Иванова, М. Гълъбова, Юл. Ананиев, Л. Матева. Оценка на флеботомията в лечението на синдрома на претоварване с желязо при неалкохолна и алкохолна стеатозна болест. Българска хепатогастроентерология, XIII, 2011, 2, 65-68.
2. **Маринова Ц**, Л. Матева. Д. Свинаров. Въглехидратно-дефицитен трансферин (CDT%) при хронични чернодробни заболявания и значението му за определяне на алкохолна злоупотреба и въздържание от алкохол. Българска хепатогастроентерология, XVI, 2014, 1,
3. **Маринова Ц**, А. Иванова, Р. Иванова, Л. Матева. Серумни нива на Цитокератин 18 при неалкохолна стеатозна болест, хронични вирусни хепатити и здрави лица. Българска хепатогастроентерология, XVI, 2014, 1,
4. R. Ivanova, M. Gospodinova, **Cv. Marinova**, A. Alexiev, S. Denchev, L. Mateva. Statin Therapy in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk. Comptes rendus de l'Acade'mie bulgare des Sciences, 67, 2014, 3, 435-448. (IF 0.211)

Спиисък на научни участия в български и международни форуми във връзка с дисертацията

1. Атанасова Е., Я. Валериева, **Ц. Маринова**, Д. Желев, К. Антонов, Л. Матева, З. Кръстев. Терапевтични подходи при лечение на пациенти с дългогодишна HBV-инфекция. Национална конференция по

гастроентерология- 100 години Ташо Ташев, Пловдив, 22-24 октомври, 2009.

2. **C. Marinova**, R. Ivanova, A. Alexiev, A. Ivanova, K.Antonov, D. Jelev, L. Mateva. Surrogate markers of insulin sensitivity/resitance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C. The International Liver Congress, Austria, Vienna, April 14-18, 2010. Journal of Hepatology, 52, Suppl 1, 2010, 149.
3. **C. Marinova**, A. Alexiev, K. Antonov, D. Jelev, L. Mateva, R. Ivanova. Metabolic syndrome and surrogate markers of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), chronic hepatitis C (CHC) and B (CHB) in Bulgaria. The International Liver Congress, Spain, Barcelona, April 18-22, 2012. Journal of Hepatology, 56, Suppl 2, 2012, 515.
4. **C. Marinova**, L.Mateva, D. Svinarov. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in chronic liver disease. 7th Central European Gastroenterology Meeting, Romania, Cluj-Napoca, 27-29 September, 2012. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, 21, Suppl 3, 2012, 22.
5. **C. Marinova**, R. Ivanova, A. Alexiev, A. Ivanova, K.Antonov, D. Jelev, L. Mateva. Surrogate markers of insulin sensitivity/resitance in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and chronic hepatitis C (CHC). 7th Central European Gastroenterology Meeting, Romania, Cluj-Napoca, 27-29 September, 2012. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, 21, Suppl 3, 2012, 22.
6. **C. Marinova**, A. Alexiev, K. Antonov, D. Jelev, R. Ivanova, L. Mateva. Metabolic face of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), chronic hepatitis (CHC) and B (CHB) in Bulgaria. 7th Central European Gastroenterology Meeting, Romania, Cluj-Napoca, 27-29 September, 2012. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, 21, Suppl 3, 2012, 22.

7. **C. Marinova**, L.Mateva, D. Svinarov. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in chronic liver disease. Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB), Bulgaria, Varna, 9-12 May, 2013.