

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

**МЕТАБОЛИТНИ МАРКЕРИ НА ХРОНИЧНИТЕ ЧЕРНОДРОБНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ**

Дисертационен труд
за присъждане на научно-образователна степен „Доктор” на
д-р Цветелина Димитрова Маринова

Научна специалност - Гастроентерология

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

София, 2014

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	2 стр.
Въведение.....	5 стр.
Литературен обзор.....	7 стр.
Цел и задачи.....	35 стр.
Материал и методи.....	37 стр.
Резултати	48 стр.
Обсъждане.....	97 стр.
Изводи.....	108 стр.
Литература.....	110 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

НГН – 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)D₂– 25-хидрокси витамин D₂

25(OH)D₃– 25-хидрокси витамин D₃

1,25(OH)₂D₃– 1.25-дихидрокси витамин D₃

На латиница:

AUDIT - Alcohol Using Disorder Identification Test

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

CDT% - релативен CDT

СК18 - цитокератин 18

CRP – С-рактивен протеин

DBP – витамин Д свързващ 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

НОМА-IR – Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance

IgG – имуглобулин Г

LDL - Липопротеини с ниска плътност

LDL-х – LDL- холестерол

Max – максимална стойност

Min – минимална стойност

PTH - паратхормон

Sx - стандартно отклонение

VLDL – Липопротеини с много ниска плътност

VDR – витамин Д рецептор

x – 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 определяве 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 (M65 и M30). 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-мощно 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 ѝ за еволюцията на ХХС и терапевтичният отговор при интерферон-алфа базираното противовирусно лечение. Усилено се изучава и връзката ѝ с 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 връзка 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 намаленият 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. Обогащването 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. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Неалкохолната стеатозна болест и алкохолната чернодробна болест са социално-значими заболявания, които заемат голям дял от чернодробната патология. Честотата им сред населението непрекъснато нараства. Както АЧБ, така и НАСБ са клинично-морфологични понятия, включващи целия спектър на морфологични и клинични форми на увреждане - стеатоза, стеатозен хепатит, с или без фиброза и цироза (51, 107, 115).

Простата стеатоза в повечето случаи е с доброкачествен и непрогресиращ ход. Преминаването ѝ в неалкохолен стеатозен НАСХ или в алкохолен стеатозен хепатит възниква при съответни стимули за клетъчна смърт (втори тласък). Тези стимули са и причината за прогресията до фиброза и цироза, с всички нейни усложнения и риск от развитието на хепатоцелуларен карцином. Прогресивният ход на хепатитите, особено на алкохолния, ги прави едни от основните фактори за чернодробната смъртност и заболяемост (21, 22, 42, 90). От друга страна НАСХ е свързан с повишена обща сърдечно-съдова, а в последно време и с чернодробна смъртност. Наличието на НАС и консумацията на алкохол при хроничните вирусни хепатити, особено при ХХС, водят до по-тежко протичане, по-бърза прогресия на фиброзата и по-тежка цироза, с по-голяма честота на нейните усложнения и хепатоцелуларен карцином.

Диагнозата на НАСХ/АСХ е затруднена поради липсата на специфични неинвазивни диагностични тестове. Двете заболявания имат сходната клинична картина, неспецифичните лабораторни промени, които невинаги корелират с хистологичните промени в черния дроб. Единственият до сега сигурен метод за потвърждаване на диагнозата и оценка на стадия на заболяването остава чернодробната биопсия с последващо хистологично

изследване. Като инвазивен метод, биопсията има своите ограничения - риск от усложнения и смърт, несъгласие на пациентите за извършването и или технически проблеми при интерпретация. Стеатозата и стеатозният хепатит имат специфични морфологични белези, но не може да се разграничи алкохолната от неалкохолната етиология.

Ето защо се налага търсенето на нови неинвазивни, но достатъчно специфични и чувствителни биомаркери, позволяващи разграничаването на стеатозата от стеатозния хепатит и степента на фиброза. В тази насока се търсят и биомаркери за оценка на степента на апоптозата, съответно свързаните с нея възпаление и фиброза. Един от тези серумни маркери е цитокератин 18 - неговата обща (M65) и каспаза-генерираната фракция (M30). Търсят се и специфични маркери за оценка на алкохолната консумация и въздържанието от алкохол, такива които биха могли да отразяват количеството, продължителността и характерка на консумация. Продължава да се изучава ролята на черния дроб като част от метаболитния синдром, интимния механизъм на инсулиновата резистентност и съответните тригери за напредване на болестта, включително и влиянието и на хепатотропните вируси върху тези процеси. Интерес представлява данните на ролята на витамин Д не само в калицевата хомеостаза, но участието му в редица важни процеси за организма като цяло. Ето защо промените при хронични чернодробни заболявания се изучават много усилено.

1. Въглехидратно-дефицитен трансферин (carbohydrate-deficient transferrin - CDT) при ХЧЗ и значението му за определяне на алкохолната консумация

Алкохолът засяга всички сфери на човешкия живот. Той има социални, медицински, психиатрични и съдебно-медицински последици. Алкохолната зависимост остава един от основните проблеми на здравеопазването в много страни. Той не се ограничава върху определена група население, а е проблем за всеки социален слой и за всяка възрастова група. Друг феномен, свързан с алкохола, е алкохолната злоупотреба. Тя е налице тогава, когато последиците от консумацията водят до телесни и/или психосоциални вреди. В повечето случаи, когато се установи наличие на системна алкохолна консумация, има данни за АЧБ, независимо дали тя е свързана със злоупотреба или/и зависимост. АЧБ се развива не само сред зависимите, но и в 20% от лицата, консумиращи над 5 стандартни питиета за мъжете и 4 – за жените, приети еднократно, включително и само веднъж седмично. Алкохолът е токсичен фактор, който засяга комплексно различни органи и системи. Той е един от основните етиологични фактори за чернодробно заболяване. АЧБ включва целия спектър на морфологични и клинични форми на увреждане на черния дроб- АС, АХ или АСХ, алкохолна фиброза и ЧЦ (8). Наслагването на действието му върху вече съществуващо чернодробно заболяване може да влоши еволюцията и прогнозата им. АЧБ може да придружава всяко друго чернодробно заболяване (напр. хроничен вирусен хепатит, НАСБ, ЧЦ) и това трябва да се уточни (9).

Комбинацията от генетични фактори и фактори на околната среда определят възникването на чернодробното заболяване и неговата тежест. Механизмите на хепатотоксичност са комплексни, водещи до клетъчно увреждане, възпаление, фиброза и развитието на ЧЦ (75).

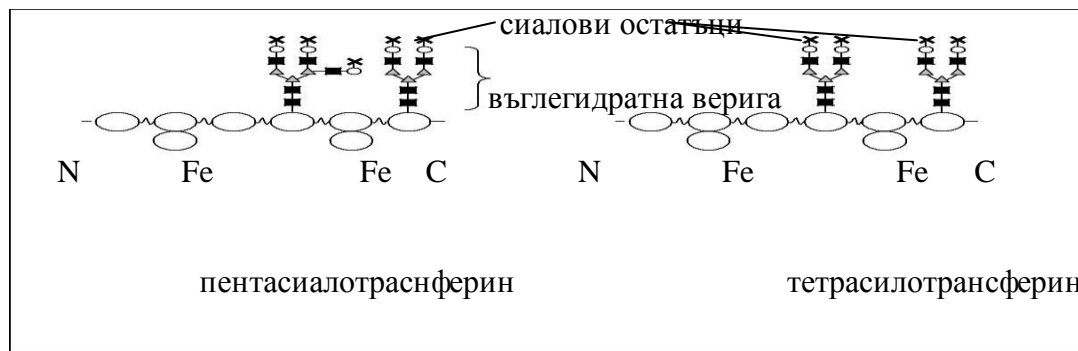
Етиологичната диагноза е трудна. Базира се на комбинация от анамнеза за значителна алкохолна консумация (злоупотреба) и зависимост; клинични и инструментални белези за чернодробно заболяване; подкрепящи етиологията лабораторни отклонения и изключена друга етиология. Оценката на алкохолната консумация е затруднена, защото се основава на анамнестични данни. Отричането на алкохолната злоупотреба и зависимост, и несъответствието с реалната алкохолна консумация са чести при тези пациенти. За да се докажат или отхвърлят подозренията се използват информация от членовете на семейството и въпросници (77). Най-популярният от тях е въпросникът AUDIT (alcohol using disorder identification test). Той е въведен от СЗО и чрез него може да се регистрира целия спектър от проблеми, свързани с алкохола, вкл. и алкохолната зависимост. Търсят се физикални белези и лабораторни промени като индиректни данни.

До момента няма сигурен сурогатен маркер, показващ времето, количеството и продължителността на алкохолния прием. Няма консенсус относно токсичното количество приет алкохол за диагнозата на алкохолно чернодробно заболяване. Най-ниските посочени граници са 30 g абсолютен алкохол /д за мъжете (3 стандартни питиета дневно) и 10-20 g/д - за жените (1-2 стандартни питиета дневно). Днес се приема, че консумацията на тези количества абсолютен алкохол не водят самостоятелно до увреждане на черния дроб. При наличие на стеатоза, тя се приема за несвързана с алкохол или т.н. НАСБ. Консумация над 50-80 г абсолютен алкохол на ден вече се свързва с алкохолна етиология на заболяването. При голяма част от хората по света алкохолната консумация, обаче е между 20 г / съответно 30 г и 80 г абсолютен алкохол, което прави диференциалната диагноза още по-трудна. Освен анамнестични данни, за диагнозата АЧБ в клиничната практика се използват и други «индикатори» за алкохолно увреждане. От стандартните лабораторни показатели със

значимост при оценката на алкохолната етиология на ХЧЗ са и серумната активност на ГГТ, MCV – като маркер за макроцитоза и по-високите стойности на АСТ, в сравнение с АЛТ (отношение 2:1). ГГТ е неспецифичен показател и се приема като биомаркер за дългосрочна употреба. Чувствителността и специфичността му са ниски. Нарастват в комбинация с MCV и CDT. До 70 % от хората, които злоупотребяват с алкохол могат да имат стойности в границата на референтните.

Метаболити на алкохола могат да докажат консумация в краткосрочен порядък, но не могат да служат като маркер за хронична алкохолна злоупотреба. За такъв е предложен CDT, който включва въглехидратно дефицитни форми на трансферин (фиг.1), (65, 71). Трансферинът е гликопротеин с желязотранспортна функция, синтезиран основно в черния дроб. Структурно той е полипептид с две места за свързване с железни йони и две места за олигозахаридни вериги, които съдържат сиалови киселинни остатъци. Трансферинът се характеризира с микрохетерогенност, изразяваща се в различен брой свързани железни йони, различен брой олигозахаридни вериги и различна белтъчна структура. (54). Различните форми (т. нар. изоформи) на трансферина се различават по броя на сиаловите остатъци- от 0 до 8. Най-честата форма при здрави, неконсумиращи алкохол индивиди или консумиращи в минимално количество, е тетрасиалотрансферина (4 сиалово-киселинни вериги), (фиг.2). При тях може да се установят и ди-, три- и пентасиалотрансферини, но в по-малки концентрации. Молекулите с 6, 7 и 8 остатъка обикновено не се откриват, както и тези без или с едни сиалов остатък. При лица, които консумират значително количество алкохол за по-дълъг период от време (обикновено повече от 4 или 5 алкохолни напитки дневно за две или повече седмици) се нарушава синтеза на трансферина. Процентът на трансферина без, с една или две сиалови вериги се повишава, а този с три и четири - намалява (66, 154). Така трите

изформи асиалотрансферин, моно- и дисиалотраснферин заедно образуват фракцията на въглехидратно-дефицитния траснферин- CDT. За първи път е описан от Stibler и Kjeliin в серум и цереброспинална теченост през 1976. (147). Представен е основно от дисиалотрансферин (DST). Полуживотът му е около две седмици. Дневният прием на повече от 60г абсолютен алкохол за период от две седмици е достатъчен за значително покачване на CDT в кръвта. Средно толкова време е необходимо и за нормализиране на стойностите му при въздържание от алкохол. (27, 71, 146).

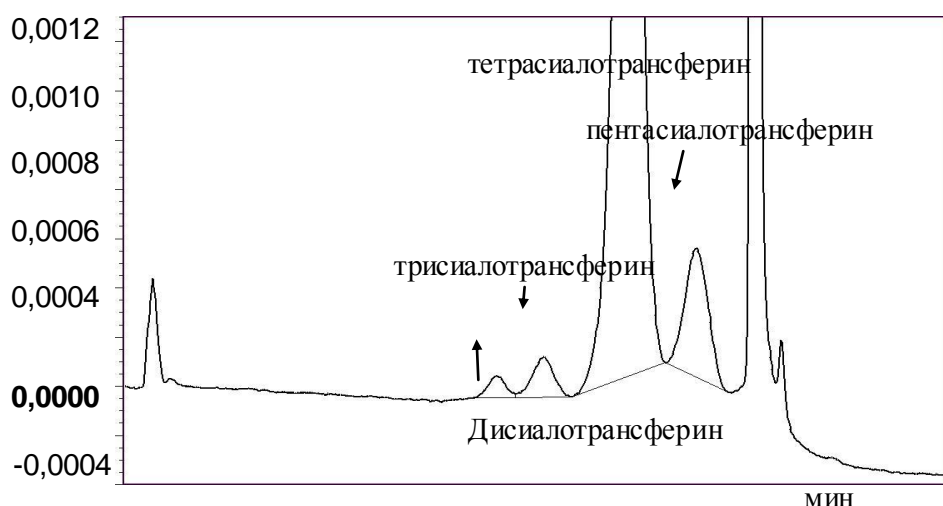


Фигура 1. Структура на трансфериновата молекула

Механизмът на повишаване на CDT при алкохолната злоупотреба не е напълно изяснен. Най-вероятно се дължи на увреждане на синтеза на въглехидратните вериги в апарата на Голджи от алкохола и/или неговите метаболити, главно ацеталдехида, основно чрез намаляване на активността на ензима сиалотрансфераза (148).

Фалшиво положителни резултати са възможни при някои редки генетични варианти на трансферина, които са свързани с разлика в аминокиселинния състав. Те могат да се отличат чрез течна хроматография по тяхната специфична хроматограма (варианти Tf- BC, Tf-CD, C2C3). Фалшиво отрицателни резултати могат да се дължат на ниска концентрация на CDT и избрания метод.

За изследване на абсолютния CDT се използват конвенционални радиоимунологични и ензимни методи. За оценка на по-информативния релативен CDT (CDT%) се прилагат турбидиметрични методи, течна хроматография (HPLC) и капилярна електрофореза. При HPLC (HPLC-high performance liquid chromatography) мобилната фаза преминава през колона от стационарната под високо налягане. 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 (33, 34, 80).



Фигура 2. Хроматограма на CDT при липса на консумация на алкохол

За оценката на алкохолната консумация се използва CDT%, който представлява отношението на абсолютния CDT към общия трансферин.

$$\%CDT = \frac{CDT}{\text{общ трансферин}} \times 100$$

По този начин се намалява влиянието на вариациите на общия серумен трансферин в случаите на желязно пренатоварване или желязен дефицит.

Други състояния, при които могат да се повлияят стойностите на CDT са бъбречни заболявания с протеинурия, хипертония или декомпенсирано чернодробно заболяване (4,77). При възпаление се установява намаляване на сиаловите остатъци на трансферина и нарастване на CDT (133). При здрави лица количеството на CDT% е по-малко от 1.2%, или 1.7% според други автори. За патологични се приемат стойности над 2.5% или над 3 % (cut-off стойност) в зависимост от използвания метод. Резултати между 1.2% (респ.1.7%) и 2.5% (3%) попадат в т.н. сива зона и подлежат на допълнителни изследвания (80).

Според други автори CDT%, може да бъде под посочената cut-off стойност за съответния метод, въпреки сигурните данни за алкохолна злоупотреба. Въпреки това стойностите му корелират с давността и количеството на приетия алкохол. Това прави CDT%, подходящ за проследяване през периода на абстиненция. С удължаване периода на въздържание се наблюдава понижение в стойностите му (52, 139).

Несъответствието между получените резултати и анамнезата могат да се обяснят и с тежестта на чернодробното заболяване, особено при декомпенсирана ЧЦ (139).

От изоформите най-силна корелация с анамнестичните данни за алкохолен прием има диасиалотрансферина (DST%). При изследване на пациенти, които не консумират или консумират малко / умерено количество алкохол и такива, които приемат голямо количество (60-450 г), т.нар. „heavy drinkers”, резултатите не показват разлика между DST% за двата пола, но само в групата на неконсумиращите. При останалите две групи DST% е с по- високи стойности при мъжете. Резултатите за CDT% също не показват разлика за двата пола при здрави лица, но значима такава се наблюдава между пациенти с чернодробно увреждане с и без алкохолна злоупотреба (100). Повишен CDT е установен при бременни, но в рамките на референтните стойности (125). Противоречиви са резултатите за

връзката между CDT и общия трансферин (64, 118). Данните за влиянието на приема на медикаменти върху изоформите на трансферина са недостатъчни (145).

CDT е изследван при пациенти с алкохолна зависимост, чернодробни нарушения с алкохолен и неалкохолен произход (неспецифично повишена ГГТ, хепатити, алкохолна и неалкохолна цироза). Чувствителността и специфичността на CDT и CDT% самостоятелно в сравнение с тях е съответно 70% и 75%. (72). При комбинирането им тези проценти нарастват. Диагностичната специфичност на CDT е 93% при пациенти с неспецифично повишена ГГТ, 88% - с хепатити и 70% - с неалкохолна цироза. Чувствителността му за пациенти с алкохолна зависимост се равнява на 73% (8). Тя може да се повлияе от типа и времето на консумация, отнесено към момента на вземане на биологичния материал. По-голяма промяна в стойностите на серумния CDT се отчита при консумация на по-малки количества за по-дълъг период, отколкото на по-големи за по-кратък (46, 62).

Чувствителността на стандартните биомаркери ГГТ, АСТ/АЛТ и MCV се движи между 35% и 73%, а специфичността - между 75 и 86%. ГГТ и MCV заедно откриват 70% от алкохолно-зависимата популация, а комбинирането им с CDT% дава резултати до 88 % (77, 85). С увеличаването на дневния алкохолен прием нараства и чувствителността на комбинацията от CDT и ГГТ. Тя е по-голяма при т.нар. „heavy drinkers”, в сравнение с умерено консумиращите и сходна между послените и въздържателите. Не са установени значими корелации между абсолютния или релативния CDT със стойностите на ГГТ (81, 84, 140).

В заключение, анализът на данните в литературата показват, че CDT% е специфичен, но не достатъчно чувствителен маркер за алкохолна консумация. Той може да покаже само продължителна значителна хронична злоупотреба. Негативните резултати не винаги кореспондират с

алкохолната анамнеза, но стойностите му корелират с количеството и продължителността на консумацията. Това го прави подходящ маркер за проследяване на пациенти с абстиненция в динамика. Комбинацията му с други маркери повишава чувствителността. От друга страна много автори критикуват метода и не подкрепят тези резултати.

2. Цитокератин 18 (M30 и M65) при ХЧЗ като маркер за клетъчната смърт

Както АЧБ, така и НАСБ са клинично-морфологични понятия, включващи целия спектър на морфологични и клинични форми на увреждане - стеатоза, стеатозен хепатит, с или без фиброза и цироза. Простата стеатоза в повечето случаи е с доброкачествен ход, но може да премине в стеатозен хепатит при съответни стимули за клетъчна смърт с последващо прогресиране до фиброза и цироза.

Всичко това налага търсенето на нови неинвазивни маркери, позволяващи разграничаването на стеатозата от стеатозния хепатит и степента на фиброза. В тази насока маркерите за оценка на степента на апоптоза, съответно свързаното с нея възпаление и фиброза биха били полезни за нуждите на клиничната практика. Един от тези серумни маркери е цитокератин 18 (СК18) и по-специално неговата обща (M65) и каспаза-генерираната фракция-(M30).

Като маркер за апоптоза/некроза и индикатор за чернодробно възпаление, се предполага, че СК18 може да се прилага за разграничаването на обикновената непрогресивна стеатоза от стеатозния хепатит, особено в случаите с НАСБ, т.е. предсказване на по-активно и прогресивно заболяване и определяне на рисковите групи пациенти, при които трябва да се започне активно лечение. Все още няма достатъчно данни при болни с вирусни хепатити и придружаваща стеатоза.

НАСХ, като част от НАСБ, е свързан с метаболитния синдром, затлъстяването и захарния диабет, повишения сърдечносъдов риск. Висококалорийната диета и заседналият начин на живот водят до екцесивно отлагане на мастна тъкан в организма. Мастната тъкан като ендокринен орган иницира серия от метаболитни промени, водещи до инсулинова резистентност и добре познатите белези на метаболитния синдром - повишена коремна обиколка, хиперглицеридемия, хиперхолестеролемия, артериална хипертония, висока кръвна захар на гладно (3, 8). Оксидативният стрес води до натрупване на свободни радикали, а те от своя страна се считат за основните фактори за клетъчната смърт и за прогресия на заболяването (110). Алкохолът и неговите метаболити също отключват верига от окислително-редукционни процеси, оксидативен стрес, липидна пероксидация, свободни радикали и отново клетъчна смърт (2, 167).

Апоптозата е физиологичен процес на програмирана клетъчна смърт, протичаща на ниво клетка. Той има за цел по-ефективно адаптиране на организма към заобикалящата го среда. За разлика от некрозата, която е патологичен процес и е резултат на неблагоприятни външни въздействия, апоптозата започва вътреклетъчно. Тя е свързана с множество биохимични процеси, причиняващи необратими морфологични промени - фрагментация на ДНК, промени в клетъчната мембрана, кондензация на хроматина и други, несъвместими с нормалното функциониране и оцеляване на клетката. В резултат на клетъчната смърт в плазмата постъпват компоненти на клетъчния строеж, отразяващи настъпилата апоптоза. Те могат да бъдат ДНК фрагменти, протеолитични ензими или части от клетъчния скелет. Такива са цитокератините, представители на интермедиерните филаменти на епителните клетки (167).

Независимо от пътя на активиране на апоптозата - външен (чрез повърхностни рецептори за клетъчна смърт) или вътрешен (чрез

митохондриално увреждане), се стига до инициране на ефекторни каспази, които разделят клетъчните структури, в резултат на което в системната циркулация постъпват апоптични продукти. Новите диагностични тестове имат за цел откриване на тези апоптични маркери и лиганди на програмираната клетъчна смърт - нуклеозоми, каспази, цитокератинови фрагменти, разтворими вътреклетъчни адхезионни молекули. Освен потенциала им като нови диагностични маркери, те могат да допринесат за оценка на тежестта на чернодробните заболявания и за терапевтичния мониторинг. Каспазите (аспартат-специфични цистеинови протеази) са протеолитични ензими, разделящи СК18, което води до експресия на нови епитопи на клетъчната повърхност, намиращи се на мястото на отделения цитокератин. Тези епитопи могат да бъдат разпознати от съответните специфични моноклонални антитела- за обща фракция на СК18 в серума М65 и за каспаза-3-генерираната фракция-М30 (30, 167).

СК18 е специфичен интермедиерен филамент на епителни клетки- чернодробни, синусоидални, клетките на жлъчните пътища, но не и на мезенхимните клетки. Представлява около 5 % от общия протеин в черния дроб, екзокринния панкреас, тънкото черво и други тъкани. Той може да бъде повишен при НАСХ, алкохолен хепатит, хепатоцелуларен карцином, вирусни хепатити и холестатичните чернодробни заболявания. Основната му роля е поддържане на клетъчната форма и на клетъчните органи в едно положение. Той е структурен компонент на ядрената ламина. Отделянето му при апоптозата е потвърдено *in vitro* при много проучвания с изкуствено индуцирана клетъчна смърт чрез медикаменти (даномидин, етопозид), ултравиолетова светлина, чрез едновременното му изследване с ДНК фрагменти, отделени при клетъчната деградация. Освен за отдиференцирането на стеатозата от НАСХ и на стеатозата от АСХ, епителният му произход позволява да се използва и като маркер за

епителна диференциация при тумори. Данни сочат, че съществува връзка между нивото на СК18 М30 и наличието на хепатоцелуларен карцином, рецидив на заболяването или поява на чернодробни метастази при друг първичен карцином (26, 27, 45).

Доказването на СК18 и количественото му измерване става чрез специфични моноклонални антитела М65 и М30 (Apoptosense М30 kit, Apoptosense М65 kit) и ELISA метод (170). За изследването може да се използва както серум/плазма, така и чернодробна тъкан, с последваща имунохистохимия. Това позволява съпоставяне на серумните стойности с хистологичите данни за възпаление и фиброза (оценени по NAS score/Metavir) от една страна и с имунохистохимичните от друга (45, 161). Докато М30 (каспаза-3-генерираната фракция) отразява само апоптозата, то М65 (обща фракция на СК18) е показателен и за съществуващата некроза. Определяне на съотношението М30/М65 позволява оценка на преобладаващия процес - апоптоза и/или некроза (103).

Пациентите, при които ще се прилагат методите с цел разграничаване на обикновената стеатоза и НАСХ/АСХ, разбира се, трябва да са с отхвърлени вирусни и холестатични чернодробни заболявания или карциноми. Трябва да имат данни за налична неалкохолна стеатозна болест (при налична стеатоза и алкохолна консумация под 20г дневно за жените и под 30 г за мъжете) или за алкохолна чернодробна болест (консумация над 80г абсолютен алкохол за ден) (2).

Проучвания на такива пациенти с НАСБ и здрави контроли сочат, че серумното ниво на общия СК18 варира между 68-3000 U/l, като стойностите му са значително по-високи при пациенти с НАСХ в сравнение със здравите контроли ($p < 0.001$) и корелират с тежестта на заболяването: средните стойности за НАСХ са 361 U/l (230-549), за стеатоза- 182 U/l (139-242), гранични пациенти- 179 U/l (148-260) и при

зdrави контроли- 145 U/l (126-190). Това прави СК18 предиктор на НАСХ с чувствителност 75 % и специфичност 81 % (97, 127).

Същата корелация се установява не само при изследването на М65 антигена , но и на каспаза-генерирания М30 цитокератин - значително по-висок при пациентите с хистологично доказан НАСХ в сравнение с другите групи. М30 > 121.6 U/l с чувствителност 60% и специфичност 97.4% говори за диагноза НАСХ (11). За М30 не са установени полови различия.

Други изследвания показват аналогични данни – ниво на СК18 много по-високо при НАСХ (394 ± 53 U/L) от колкото при стеатозата (194 ± 26 U/L, P<0.05). Това предполага ролята му биомаркер за НАСХ. Допълнително чернодробна биопсия може да се прави при високорисковите за прогресия на заболяването пациенти, за да се определи NAS score. Това са пациенти в напреднала възраст, с висок индекс на телесна маса, захарен диабет 2 тип, високи аминотрансферази, СК 18> 300 U/L. Пациентите трябва да са биопсирани в рамките на 6 месеца от вземането на кръвните проби. NAS score се оценява, използвайки хистологични материали, оцветени с хематоксилин/еозин: стеатоза(0-3), лобуларно възпаление (0-3), балонна дегенерация на хепатоцитите (0-3). Оценка от 1-3 точки отговаря на стеатоза, а от 4-8 на НАСХ. При пациентите с високи стойности на СК18, както при НАСХ, се е получила хистологична оценка на NAS score > 4 (15, 29, 110).

Същите хистологични материали се оценяват по Metavir score за стадий на фиброза: F0- само стеатоза без фиброза и налична фиброза F1-F4. Почти всички пациенти с NAS score > 4 (n=60) имат фиброза F1-F4 (n=66). Следователно СК 18 може да се използва и като сурогатен маркер за чернодробна фиброза, след като фиброзата може да се види при НАСХ, но не и при обикновената стеатоза. Дори според други автори покачването на

СК18 е стъпаловидно според степента на фиброзата при пациентите с НАСХ (20, 110).

Подобни са резултатите и при пациенти с алкохолен хепатит-значително по-високи стойности на СК18 в сравнение с пациентите със стеатоза. Установено е, че нивата на цитокератина корелират със степента на алкохолната злоупотреба. Както и при НАСХ, стойностите на СК18 са по-високи при по-висока степен на фиброза (97). Изследването на СК18 заедно с други биомаркери за алкохолна употреба/злоупотреба - неспецифични (АСТ, АЛТ, ГГТ, макроцитоза), и специфични (CDT), значително ще повиши ефективността на диагностичния процес (70).

За сега обаче липсват сравнителни данни за стойностите на СК18, съответно неговите фракции М30 и М65, при НАСХ и АСХ. Откриването на статистически значима разлика ще улесни диагностичния процес и би могло да спомогне за изграждането на диагностичен панел от биомаркери за алкохолната чернодробна болест.

Интерес представляват данните за СК18 при пациенти с хроничен хепатит С. Според тях СК18 може да бъде много надежден маркер за чернодробно увреждане, както и аминотрансферазите. При пациенти със серумни аминотрансферази в референтни граници е имало значително високи стойности на М30. Те обаче са били по-ниски в сравнение с групата с хроничен С хепатит и повишени аминотрансферази. Резултатите за средните М30 при отделните групи са: 54.5 U/l за здравите контроли, М30-80.1 U/l за пациентите с хроничен С хепатит, но все пак по-ниски от пациентите с НАСХ- М30 -144.1 U/l. Това поставя пациентите с НАСХ в по-рискова група по отношение на клетъчна загуба в резултат на апоптоза и възпаление в сравнение с тези с вирусна инфекция (16, 19, 28, 137).

Натрупаните до този момент данни в литературата показват, че СК18 (М30 и М65) е обещаващ скринингов маркер за хепатит и за стадиране на чернодробната фиброза. Възлагат се надежди този маркер да позволи

ранно откриване на чернодробна токсичност, прогнозиране на заболяването и оценка на терапевтичния отговор. СК18 е най-перспективния маркер за оценка на клетъчнат смърт при хроничните чернодробни заболявания, особено при НАСБ и АЧБ (127, 168).

3. Промени на 25(ОН) витамин Д₃ при ХЧЗ

Витамин Д е витамин от групата на мастноразтворимите витамини, с голямо значение за нормалната функция на организма и регулирането на неговата хомеостаза. По последни данни неговата важна роля все още се доразкрива, поради установяване на вит Д дефицит в голяма част от населението със съвремен, западен тип начин на живот.

Две са основните форми на витамини, които се откриват в човешкия организъм - холекалциферол (витамин Д₃) и растителния му аналог ергокалциферол (витамин Д₂). След поподаването им в организма те се метаболизират до 25-хидрокси витамин Д₃ (Д₂) в черния дроб и до 1,25-дихрокси витамин Д₃ (Д₂) (калцитриол) в бъбреците – хормон регулатор на калциевата обмяна (4). Растителните форми на витамин Д са биологично по-непълноценни за човека.

Витамин Д заема централна роля в калциевата хомеостаза. В епидемиологични проучвания през последните 10-15 г се разкриват и неговите некалциотропни ефекти, свързани с регулация на клетъчния растеж, диференциация и пролиферация; с регулация на клетъчната апоптоза; неговото имуномодулаторно действие чрез регулация функцията на макрофаги, дендритни клетки, Т- и В-лимфоцити. Тези плейотропни ефекти се обуславят от възможността всяка клетка на организма да синтезира калцитриол за собствените си нужди (апокринна функция на витамин Д).

Концентрацията на витамин Д₃ в организма се контролира чрез хранителния прием и чрез собствен синтез в кожата. Синтезата на витамин Д₃ в кожата става от холестероловия прекурсор 7-дехидрохолоестерол под действието на ултравиолетовата слъчева светлина с дължина на вълната 295-315 nm. Обикновено чрез храна се осигурява до 10-20%, а чрез синтез над 80-90% от нуждите. Независимо от начина на постъпване, екзогенен или ендогенен, цикълът на витамин Д₃ след това е свързан с активиране в черния дроб и в бъбреците. В черния дроб се превръща в 25(ОН)Д₃ под действието на ензима 25-хидроксилаза. 25(ОН)Д₃ е с относително дълъг полуживот – около 15 дни, като в циркулацията голяма част от него съществува като комплекс със специфичен свързващ протеин (DBP). Този комплекс след постъпване в бъбречните проксимални тубулни клетки се хидроксилира от 1-алфа хидроксилаза до 1,25(ОН)₂Д₃. 1,25-дихроксиолекалциферолът е активната форма на витамин Д с биологично действие. Той преминава във вътреклетъчното пространство и се свързва с ядрени рецептори (VDR) от групата на рецепторите за стероидни/тиреоидни хормони, които регулират генната транскрипция (95).

1,25(ОН)₂Д₃ има основна роля в поддържането на плазмената калциева концентрация в тесни граници. Неговата бъбречна синтеза от своя страна се контролира от PTH и фибробластен растежен фактор 23 (б). Настъпилата хипокалциемия стимулира секрецията на PTH. Той повлиява бъбречните тубули, което води до намаляване на калциевата секреция, на фосфатната реабсорбция и стимулира синтеза на калцитриола.

1,25(ОН)₂Д₃ регулира калциевата концентрация чрез стимулиране на: калиевия и фосфатен транспорт в тънките черва; калциевата реабсорбция в бъбреците; секрецията на фибробластния растежен фактор 23 (фосфатонин), а чрез него и регулация на остеокласната активност (б, 104).

Финното регулиране на калциевите концентрации се осъществява и по менахизмна на обратна връзка (3). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ директно потиска РНТ, а секретираният фибробластен растежен фактор потиска бъбречната синтезата на витамина и усилва неговото разграждане.

Независимо от факта, че $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ е активната форма на витамин Д, за оценка на витанимин Д статуса се използва плазменото ниво на $25(\text{OH})\text{D}_3$. Това се определя от факта, че той е с по-дълъг плазмен полуживот и е единствено депо-форма за всички клетки на организма. Калцитриолът е само бъбречна форма за регулция и е с кратък полуживот.

Няма консенсус по отношение на нормалните и патологични нива на $25(\text{OH})\text{D}_3$. Стойности под 25 nmol/l да се приемат за дефицит, а тези между 25 и 80 nmol/l - като недостатъчност. За поддържане на костната обмяна са необходими нива от поне 50 nmol/l , а за некалциотропните ефекти - $80-200 \text{ nmol/l}$. Този диапазон се приема като насищане (достатъчност). Всички стойности под нивата на насищане се свързват с патогенезата на хронични заболявания-остеопороза, неоплазмени заболявания, ССЗ, захарен диабет, автоимунни и възпалителни заболявания (114, 129). Предполага се, че около $1/7$ от населението на Света има недостатъчност на витамин Д. При тях дялът с дефицит ще нараства значително (69). Нормалните нива на витамин Д са също необходими за постигане на ефект от медикаментите при хроничните чернодробни заболявания, като хроничните вирусни хепатити. Дневният препоръчителен хранителен прием на витамин Д е различен за различните възрастови групи. За лицата между 19 и 70 г необходимото количество е 600 IU/ден , което се равнява на $15 \text{ }\mu\text{g/ден}$ (47). При дефицит под 80 nmol/L е необходимо заместване с $50\,000 \text{ IU}$ витамин Д седмично за 8 седмици (86), най-добре – при ежедневен прием.

Обсъждат се следните причини за дефицит и недостатъчност:

- намален синтез в кожата, в следствие на недостачно излагане на слънце; използване на слънцезащитни средства с високо ниво на

слънцезащитен фактор (87); по-високото съдържание на меланин при тъмно пигментирана кожа (50);

- увеличен катаболизъм;
- намалена абсорбция в стомашно-чревния тракт- муковсицидоза, възпалителни чревни заболявания, след чревни резекции (106);
- затлъстяване - дефицитът е свързан с отлагане на ендогенния витамин в подкожната мастна тъкан (163);
- намален синтез на 25(OH)D₃ при хронични чернодробни заболявания;
- увеличена загуба или намален синтез (при хронични бъбречни заболявания, свързани с белтъчна загуба; бъбречна недостатъчност с вторичен хиперпаратиреоидизъм);
- вродени заболявания, водещи до витамин Д резистентност;
- недостатъчен хранителен внос.

За пациенти с риск за дефицит/недостъчност се препоръчва изследване на нивата на 25(OH)D₃, а при нужда и провеждане на заместителна терапия с последващо мониториране. Към тях спадат: възрастни пациенти, бременни жени, пациенти със захарен диабет, затлъстяване, артериална хипертония; с автоимунни и онкологични заболявания. VDR се намират в еднотелните клетки, кардиомиоцитите и гладкомускулните клетки. Според публикувани данни витамин Д дефицитът има връзка с повишеното артериално налягане, развитието на атеросклероза, кардиомиопатия и съдова тромбоза (156, 159). Чрез ядрените рецептори се активират ренин-ангиотензин-алдостероновата система, увеличава се атриалния натриуретичен пептид (68), активират се макрофаги и лимфоцити, с последваща каскада от включване на различни сигнали и невромедиатори (156).

Ролята на витамин Д в потискането на неопластичните заболявания е свързана с блокирането на цикъла на клетъчно делене в първите фази G0-

G1, индуцирането на инхибитори на пролиферацията (165), индуцирането на апоптозата в туморни клетки (113, 157) и диференциация на клетките от моноцитно-макрофагеалната линия (93).

VDR са установени и в бета-панкреасните клетки. Витамин Д има значение за нормалното инсулиново освобождаване при глюкозно натоварване, както и за поддържането на глюкозния толеранс (48, 143). Приемането на витамин Д за корекция на наличен дефицит води на понижаване на нивата на кръвната захар (25).

Намаленото ниво на 25(OH)D₃ при пациенти със затлъстяване се отдава на сложното влияние на адипокините, произвеждани от мастната тъкан, върху синтеза на витамина (98) или просто на “захващане” на витамина в тъканта (57). Отчетено е подобряване на телесното тегло след заместителна терапия с витамин Д, но до момента не са изяснени точните механизми на редукция на теглото (156).

НАСБ предопределя по-ниски нива на 25(OH)D₃ в сравнение със здрави индивиди, независимо от наличието на метаболитен синдром, диабет или наличие на инсулинова резистентност (31). При пациенти с АЧБ също са установени ниски нива на витамин Д, корелирани с намалена костна плътност, показатели, които се подобряват след заместителна терапия. Промените тук се обясняват с малнутриция и токсично увреждане на черния дроб, с последващо намалено активиране на витамин Д₃ (119).

По-ниски 25(OH)D₃ са регистрирани при налична чернодробна цироза в сравнение с хронични вирусни хепатити и пациенти без чернодродно заболяване, заедно със значими корелации с албумина, DBP с нивата на 25-OHD₃, 1,25-(OH)₂D₃, и PTH (335). При сравняване между алкохолна цироза и неалкохолна цироза средните стойности на 25-хидроксиголекациферола са по-ниски при алкохолната цироза, но без статистическа значимост (96). Витамин Д дефицитът е свързан със

степената на нарушение на чернодробната функция, оценена по Child-Pugh и MELD скалата, а не толкова с етиологията на цирозата (63, 73, 126).

Витамин Д дефицитът е очакван и често срещан при първична билиарна цироза и хронични холестатични заболявания поради нарушената абсорбция на мастноразтворими витамини. По данни на едно ретроспективно проучване се установява, че дефицитът на 25(ОН)Д е много по-чест и в по-голяма степен при алкохолна чернодробна цироза в сравнение с първичната билиарна цироза. Това може да бъде свързано с нарушение на хидроксилринето в черния дроб, намален хранителен внос, намален синтез на DBP, намален кожен синтез поради намалено слънчево излагане или наличие на иктер (78). При разделянето на групите според Child-Pugh класификацията се открива връзка с дефицита на Д₃ и тежестта на цирозата. Това още веднъж потвърждава факта, че наличието на дефицит/недостатъчност на витамин Д е свързан повече със степента на увреждане на черния дроб, отколкото с етиологията на цирозата (109).

При проучвания при пациенти с ХХС също са установени дефицит и недостатъчност на витамин Д₃ в 52% до 91%. При едни от тях не са установени връзки на неговите нива с биохимичната активност, вирусния товар или степента на фиброза на черния дроб (101). При други е показана противовъзпалителната, антифибротичната и противовирусната функция на витамин Д₃ в динамика и неговото положително влияние върху трайния вирусологичен отговор като добавка към специфичното противовирусно лечение (47, 135). Тежестта на чернодробното заболяване повишава риска от дефицит на витамин Д. От друга страна има доказателства, че дефицитът от своя страна влошава чернодробната фиброза и тази в други системи, например в дихателната (136). Това се обяснява с участието на витамин Д в регулацията на фибробластната миграция и продукцията на екстрацелуларния матрикс (150); в активирането на Т-лимфоцитите в

имунния отговор срещу HCV инфекцията и като антиапоптичен фактор за хепатоцитите (123).

В изследвания на групи пациенти с ХХВ е установена значима обратна връзка между нивата на 25(ОН)Д₃ с вирусната ДНК, в сравнение със здрави контроли и лица, преболедували В инфекция (55). Други данни показват и сезонна флукуация на стойностите на вирусната репликация, подобно на витамин Д₃. Това предполага функционално взаимодействие между двата показателя (60).

За количествено определяне на 25(ОН)Д в серум/плазма се използват методи, които могат да изследват и 25(ОН)Д₂ и 25(ОН)Д₃. Те се разделят в две основни групи - имунохимични и хроматографски (15). Имунохимичните в началото са били трудоемки поради дългата си пробоподготовка. След това се въвеждат RIA метод и хемилуминисцентните тестове (88). Съществуват и ELISA методи. Хроматографските анализи лежат в основата на директните методи за количествено определяне на 25(ОН)Д - вискоефективна течна хроматография с ултравиолетова или мас-спектрометрична детекция. Това е метод с висока селективност и чувствителност, способен за точно количествено определяне на 25(ОН)Д₂ и 25(ОН)Д₃. Използването на различни методи затруднява сравняването на резултатите от различни автори.

4. Характеристика на метаболитните промени при ХЧЗ с и без стеатоза

Черният дроб заемат основно място в глюкозния и липиден метаболизъм, както и в действието и метаболизма на хормоните (15,,16, 19, 24, 128, 134, 141, 153, 158). Всяко чернодробно увреждане се отразява на тези функции на черния дроб. През последните години усилено се проучва значението на

неалкохолната стеатоза (НАСБ) и свързаната с нея ИР, оценена с различни сурогатни маркери, като кофактор за допълнително увреждане на черния дроб (40, 41, 44, 53, 116, 131, 138). Оксидативният стрес, липидната пероксидация, проинфламаторните цитокини с последващи възпаление, апоптоза и фиброза се обсъждат като възможни патогенетични предпоставки както за НАСХ, така и за допълнителното влошаване на основното заболяване (107, 120, 144, 149). Много въпроси относно метаболитните промени при съчетание на НАСБ с друго чернодробно заболяване все още не са изяснени (51, 108).

От друга страна системната консумация на големи количества алкохол при лица със затлъстяване крие риск за по-тежко алкохолно увреждане и по-бърза прогресия. Трудно е разграничаването между припокриващите се НАСБ и АСБ (23, 59, 117). Механизмите на хепатотоксичността са комплексни и включват много фактори (39, 76). Не са проучени обаче метаболитните промени при това съчетание, особено като се има предвид разнообразните ефекти на алкохола, особено върху глюкозния метаболизъм. Хроничното панкреасно увреждане, предизвикано от него, води до намалено отделяне на инсулин от панкреасните островни клетки и последващо нарушение в глюкозната хомеостаза. Въпреки ясните резултати от експериментите, в ранните стадии на алкохолното чернодробно увреждане, този ефект на алкохола обикновено е неустановим поради повишеното стимулиране на инсулиновата секреция. Когато чернодробното заболяване прогресира, последва намаление на отделянето на глюкоза от черния дроб. Острият и хроничен прием на алкохол намалява подтискането на чернодробната глюкозна продукция от инсулина, както и поемането му от черния дроб. Подобни ефекти се установяват и в скелетните мускули. Механизмите на директната алкохолно предизвикана инсулиновата резистеност бяха напълно проучени на

молекулярно ниво и директните ефекти на алкохола върху глюкозния метаболизъм в черния дроб, мастната тъкан и мускулите бяха доказани.

Чернодробната стеатоза в различна степен е често срещана при хроничен хепатит С. Наблюдава се в над 50% от случаите в сравнение с тази на общата популация - 14-30% (28). Предполагат се два основни механизма - индуцирана от вируса или метаболитна стеатоза. Инсулиновата резистентност също е честа при хроничен хепатит С и достига до 69%. При пациенти с генотип 3 стеатозата се появява като резултат на директен цитопатичен ефект от самия вирус, докато при генотип 1 тя е предимно проява на метаболитния синдром. По литературни данни при генотип 3 степента на стеатоза корелира с вирусния товар в серума. (142). Предполага се, че вирусът повлиява метаболизма и/или екскрецията на мастните киселини в хепатоцитите. В по-малка степен вирусът играе роля и при генотип 1. Стеатозата, инсулиновата резистентност и хипергликемията са свързани с по-бърза прогресия на заболяването, по-лош терапевтичен отговор при един и същ вирусен товар, генотип, фиброза и възраст на пациентите (79). Въпреки многобройните проучвания, резултатите за метаболитните промени при стеатоза или НАСХ в съчетание с ХХС се противоречиви по отношение на промените в липидите.

Открит остава въпроса дали стеатозата и свързаните с нея метаболитни промени са по-честии и при ХХВ, както при ХХС. Има данни, че хроничната В вирусна инфекция е директно свързана с нарушение на глюкозния метаболизъм, вторично на увреждане на панкреасните острови. Вирусната ДНК е открита в панкреасните ацини при болни с хроничен хепатит В и нарушен глюкозен толеранс. Проучванията относно връзката между В инфекцията и НАСБ са малко, а резултатите противоречиви. Още по-малко са сравнителните проучвания между хроничен хепатит В и С (52). Честотата на стеатозата при HBV инфекция варира от 18-60% (56). Серумната ДНК не корелира със стеатозата, което предполага, че вирусът

не индуцира акумулация на масти в черния дроб. Според някои автори няма съществена разлика в метаболитните отклонения между хроничен хепатит В и С, но според други има (74, 91, 130). Подобни са и резултатите относно връзката между фиброзата и стеатозата, честота на диабет и други (152, 160).

Наблюдаваните промени в глюкозната хомеостаза могат да се дължат на директния ефект на различните етиологични фактори върху глюкозния метаболизъм, бета-клетъчна функция и инсулинова чувствителност. Такива механизми се обсъждат най-вече за алкохола и вирусната етиология. Въпреки известни разлики в етиологията на чернодробното заболяване и възможните различни патогенетични механизми, се очертава становището, че хиперинсулинемията и инсулиновата резистентност остават основните фактори за появата и задълбочаването на тези нарушения (10, 14, 43).

Независимо от натрупаните данни, няма сравнителни проучвания, разкриващи разликите и приликите при НАСБ самостоятелно и като припокриващ се синдром при най-честите заболявания – алкохолна чернодробна болест и вирусни хепатити.

5. Обобщение

Липсват достатъчно клинични проучвания върху болни с алкохолни и неалкохолни чернодробни заболявания, които да подкрепят или отхвърлят клиничното значение на CDT при ХЧЗ с или без ЧЦ. Ето защо широкото му приложение в рутинната клинична практика е ограничено. Особен проблем представлява високата стойност на CDT% за потвърждаване на значима алкохолна консумация. Много автори съобщават за изключване на

болни със сигурна алкохолна етиология при използването му. Все още няма интерпретация на т.н. сива зона. Предполагат се и генетични различия. Липсват проучвания, сравняващи промените в СДТ при неалкохолна и алкохолна стеатозна болест, както и при хронични вирусни хепатити с и без цироза.

Независимо от натрупаните данни, които показват клинично значимите промени на СК18, особено на М30, съществуват и много противоположни резултати. Ето защо все още липсват достатъчни доказателства, които да позволят въвеждането на този биомаркер в рутинната клинична практика. Не е решен проблема за значението му при болни с НАСХ и фиброза, които имат нормални аминотрансферази. При болни с ХХС е съобщено за повишение на М30 при случаите с повишен АЛТ и по-ниски стойности при АЛТ в референтни стойности. Няма валидиран стандарт за стойностите и на двата фрагмента на СК18, които да поставят или отхвърлят диагнозата стеатозен хепатит. Разлики съществуват и в използването на общия СК18 и неговите фракции. Това до голяма степен обуславя неизползването на получените резултати на клинично равнище. Липсват сравнителни проучвания между болните с АСБ и НАСБ.

Въпреки многобройните проучвания, изследващи промените във витамин Д, по-малко се знае за недостатъчността му при ХЧЗ. По-добре е проучено значението на витамин Д при ЧЦ и ХХС. Резултатите са разнопосочни поради липсата на утвърден стандарт за норма и патология, използване на различни методи и разлики в характеристиката на изследваните групи. Съществуват и географски различия. Малко са сравнителните проучвания при различни по вид чернодробни увреждания, както и между ХХС и ХХВ. По-малък е и броят спрямо здрави лица. Многобройни и различни епидемиологични и клинични проучвания са посветени на определяне на честотата и характеристиката на белезите на МС, нарушенията в глюкозата и ЗД и клиничната оценка на инсулиновата резистентност при болните

с НАСБ. Въпреки използването на различни определения, класификации и норми е доказано, че честотата на тези метаболитни нарушения е много висока. Доказано е, че НАСБ е важен фактор за по-ранна изява и разгръщане на метаболитен синдром. Тя е независим рисков фактор за изява на ЗД и е тясно свързана с инсулиновата резистентност. НАС като придружаващо състояние, насложено върху друго чернодробно заболяване е много по-слабо проучена. Изследванията се фокусират предимно на влиянието на стеатозата като фактор допълнително задълбочаващ еволюцията на основното чернодробно заболяване. Най-голям брой проучвания са проведени при ХХС. Малко се знае за метаболитните отклонения при ХХВ. Липсват сравнителни проучвания за честотата и степента на отклоненията при болни с и без стеатоза. Влиянието на абдоминалното и общо затлъстяване върху метаболитните промени при АСБ също остава един открит въпрос. Липсват сравнителни проучвания в тази насока при най-честите заболявания на черния дроб. Не е изследвана задълбочено честотата и характеристиката на метаболитните нарушения при здрави лица без стеатоза.

IV. 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, НОМА-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 НОМА-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

Анализирах 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 ± 14.27 г.: 54 % в млада възраст и 46% - на средна възраст). Всички изследвани лица нямат 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 ехографски базирана диагноза първична НАСБ (266 мъже и 141 жени от 18 до 60 г., на средна възраст 43.99 ± 11.32 г.: 53 % в млада възраст и 47% - на средна възраст). В 141 от случаите диагнозата е хистологично доказана (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 ± 10.07 г.). В 106 от случаите диагнозата е хистологично доказана (35 АС, 71 АСХ).

IV група - ХХВ: 334 болни с ХХВ (222 мъже и 112 жени от 18 до 61г.; средна възраст 42.71 ± 13.92 г.) с хистологично доказано заболяване без оформена чернодробна цироза с портална хипертония. При 160 от болните имаше 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 ± 14.10 г.), с хистологично верифицирано чернодробно заболяване без оформена чернодробна цироза с портална хипертония. Хистологични белези за стеатоза имаха 227 от болните.

VI група - ЧЦ: 85 болни с ЧЦ (60 мъже и 25 жени от 29г до 71г.; средна възраст 52.60 ± 9.58 г.). От тях 57 са с алкохолна етиология (47 мъже и 10 жени) и 28 - с неалкохолна вирусна чернодробна цироза (14 мъже и 14 жени). От пациентите с алкохолна етиология, 36 бяха в декомпенсиран стадий на цирозата, а от тези с вирусна - 7. Тежестта на чернодробната цироза според Child класификацията е представена на таблица 1.

Таблица 1. Тежест на чернодробната цироза според Child класификацията при пациентите от група VI, изследвани за CDT% (брой болни).

ЧЦ (85)	Child A	Child B	Child C
Алкохолна (57)	21	25	11
Неалкохолна (28)	21	3	4
- ХХВ (11)	- 8	- 1	- 2
- ХХС (17)	- 13	- 2	- 2

Характеристика на лицата, изследвани за CDT%

Изследвахме общо 328 лица – 39 здрави контроли (16 мъже и 23 жени от 18 до 60 г.; средна възраст 40.54 ± 15.43 г) и 289 пациенти с различна по етиология чернодробно заболяване (210 мъже и 79 жени от 18 до 72 г. ; средна възраст 46 ± 13 г.), разпределени в следните основни подгрупи:

1 група: 39 здрави лица (контроли);

2 група: 35 болни с АЧБ (33 мъже и 2 жени; средна възраст 46.59 ± 12.20 г.; от 26 до 72 г), двама от които с напреднала фиброза.

3 група: 92 болни (59 мъжете и 33 жени; средна възраст 42.57 ± 11.96 г.; от 18 до 56 г.) с НАСБ, хистологично верифицирана при 52 от тях (9 НАС, 43 НАСХ с фиброза, от които 2 – с напреднала фиброза)

4 група: 38 болни с ХХС (29 мъже и 9 жени; средна възраст 42.11±15.13 г.; от 18 до 60г.)

5 група: 39 болни с ХХВ (28 мъже и 11 жени; средна възраст 40.39±13.39 г.; от 21 до 61 г.).

6 група: 85 болни с ЧЦ (виж група VI).

Характеристиката на алкохолната консумация според анамнестичните данни е представена на таблица 2.

Таблица 2. Характеристика на алкохолната консумация (n/%) при ЗК и ХЧЗ.

Алкохол/Група	ЗК	АЧБ	НАЧБ	ХХС	ХХВ	ЧЦ	общо
0 гр	13	0	56	27	29	30	155
	8,4%	0%	36,1%	17,4%	18,7%	19,4%	100,0%
	33,3%	0%	60,9%	71,1%	74,4%	35,3%	
<30г	26	3	36	7	4	8	84
	31,0%	3,6%	42,9%	8,3%	4,8%	9,5%	100,0%
	66,7%	8,6%	39,1%	18,4%	10,3%	9,4%	
>30г	0	15	0	1	1	8	25
	0%	60,0%	0%	4,0%	4,0%	32,0%	100,0%
	0%	42,9%	0%	2,6%	2,6%	9,4%	
абстиненция > 1месец	0	11	0	0	5	35	51
	0%	21,6%	0%	0%	9,8%	68,6%	100,0%
	0%	31,4%	0%	0%	12,8%	41,2%	
абстиненция < 1месец	0	6	0	3	0	4	13
	0%	46,2%	0%	23,1%	0%	30,8%	100,0%
	0%	17,1%	0%	7,9%	0%	4,7%	4,0%
общо	39	35	92	38	39	85	328
	11,9%	10,7%	28,0%	11,6%	11,9%	25,9%	100,0%
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Характеристика на лицата, изследвани за СК18.

СК18- М30 в серума изследвахме общо при 83 лица (55 мъже и 28 жени), разпределени в следните групи:

1 група: 20 лица здрави контроли (10 мъже и 10 жени; средна възраст 43.65 ± 16.84 г, от 24 до 60г).

2 група: 20 болни с НАСБ (15 мъже и 5 жени; средна възраст 43.75 ± 12.65 г (20-60г)). Заболяването бе хистологично верифицирано при всички от тях: стеатоза (n=5), стеатоза с изолирано възпаление – гранично състояние между стеатоза и стеатозен хепатит (n=3), НАСХ (n=12) с стадий на фиброза F1/F2 (n=11) и F3-F4 (n=1).

3 група: 22 болни с ХХВ (17 мъже и 5 жени; средна възраст 30.18 ± 14.42 г от 21 до 61г) с хистологично доказано чернодорбно заболяване (табл.3)

4 група: 21 болни с ХХС (13 мъже и 8 жени; средна възраст 40.24 ± 13.03 г от 18 до 60г) с хистологично верифицирано чернодробно заболяване (виж табл.3).

Таблица 3. Хистологичен стадий на фиброза при болните с ХХВ и ХХС.

Групи	Начална фиборза	Напреднала фиборза
	F1-F2	F3-F4
ХХВ n=22	n=18	n=4
ХХС n=21	n=14	n=7

При 41 от тези лица (29 мъже и 12 жени) се изследва и СК18- М65 (група 2 - болни с НАСБ и група 4 – ХХС).

Характеристика на лицата, изследвани за витамин Д₃

25(ОН)-витамин Д (витамин Д) изследвахме в плазма общо при 324 лица (210 мъже и 114 жени), разпределени в следните групи:

1 група: 36 лица здрави контроли (15 мъже и 21 жени; средна възраст 38.61 ± 14.30 г от 18 до 60г).

2 група: 32 болни с АЧБ (30 мъже и 2 жени; средна възраст 45.91 ± 13.27 г, от 26 до 72г).

3 група: 117 болни с НАСБ (76 мъже и 41 жени, средна възраст 42.89 ± 12.37 ., от 20 до 60г).

4 група: 32 болни с ХХС (23 мъже и 9 жени, средна възраст 42.35 ± 16.31 г, от 18 до 60г).

5 група: 36 болни с ХХВ (25 мъже и 20 жени, средна възраст 40.77 ± 13.70 г, от 21 до 61г).

6 група: 71 болни с ЧЦ (51 мъже и 20 жени, средна възраст 52.26 ± 9.38 г., от 29 до 71 г).

Характеристика на лицата с и без стеатоза, изследвани за метаболитни промени

Сравнителната характеристика бе извършена при всички лица от група I до група V включително.

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 ехография - 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, аРТТ, фибриноген, CRP, общо изследване на урина;
- кръвна захар и инсулин на гладно и оценка на инсулиновата резистентност (НОМА-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- M30 (Apoptosense ELISA, Peviva) и M65 (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 Д₂ и 25(OH) витамин Д₃).
- статистическа обработка на данните.

Определяне нивото 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 асиалоттрансферина, ди- и трисиалоттрансферина. 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

След това при обработката на данните допълнително се разгледаха резултатите и според две основни групи – недостатъчност (включваща дефицита, изразената и леката недостатъчност) и достатъчност.

Измерихме количествено нивата на общия СК18 в серума – СК18-M65 или СК65, който се освобождава при клетъчна смърт (некроза и апоптоза) и неговия каспазо- генериран компонент (СК18-M30 или СК30) с неоепитоп K18sp396, отразяващ само апоптозата. И двете молекули се изследваха чрез “sandwich” ELISA метод, при който се използват специфични антитела, разпознаващи съответните епитопи. СК18-M65 ELISA съдържа две моноклонални миши антитела (M5 IgG2b и M6 IgG2a), които се свързват само с СК18. Резултатът е цветна реакция, чийто интензитет е пропорционален на цитокератиновата концентрация. СК18-M30

apoptosence ELISA също има две специфични моноклонални антитела (M5 и M30-сприцифичен само за неопитопа K18sp396). Според инструкциите на производителя на китовете се приеха следните референтни стойности: CK18-M65 - средна стойност 264 U/L; 95th перцентил 413 U/L, която приехме за “cut off” за M65; M30 - средна стойност 132 U/L; 95th перцентил 260 U/L - “cut off” за M30. Тези стойностите са изведени на базата на изследване на шведска популация (зdravi 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 (таб.4).

Таблица 4. Класификация на чернодробната цироза по по Child-Pugh.

Child-Pugh клас	А	В	С
Билирубин $\mu\text{mol/l}$	Под 34	35-51	Над 51
Албумин g/l	Над 35	35-28	Под
Протромбинов индекс или Протромбиново време или INR	Над 70% от 1 –4 sec под 1.6	70-40% 4-6 sec 1.6 – 2.0	Под 40 % над 6 sec над 2.0
Асцит	Липсва	Лесно се контролира	Трудно се поддава на контрол
Енцефалопатия	Липсва	Дискретна	Изразена
Брой точки	1	2	3

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 се приема следното:

- 10 g абсолютен алкохол (1 стандартна алкохолна единица-U) = 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 консумация, 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) (табл.5).

Таблица 5. Промени в телесната маса според ИТМ.

Група	ИТМ (kg)/m ²
Поднормена ТМ (поднормено тегло)	< 18.5
Нормална ТМ (нормално тегло)	18.5 – 24.9
Наднормена ТМ (наднормено тегло)	25.0 – 29.9
Затлъстяване	≥ 30.0

За диагнозата МС използвахме критериите, приети за нашата страна през 2010 год. от работна група към Българския институт “Метаболитен синдром” :

- повишена обиколка на талията - за мъже ≥ 94 cm, за жени ≥ 80 cm;
- повишени нива на триглицеридите - ≥ 1.7 mmol/l или прием на медикаменти за повишени триглицериди;
- намалени нива на HDL-холестерола - по-малко от 1.0 mmol/l за мъже, по-малко от 1.3 mmol/l за жени или прием на медикаменти за намалено ниво на HDL-холестерола;
- повишено артериално налягане - систолно ≥ 130 mmHg и/или диастолно ≥ 85 mmHg или прием на антихипертензивни медикаменти при анамнеза за хипертония;
- повишена плазмена глюкоза на гладно ≥ 5.6 mmol/l или прием на медикаменти за хипергликемия.

Диагнозата 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. Плазмена 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 инсулин и глюкоза на гладно. НОМА-IR изчислихме от стойностите на глюкозата (mmol/l) и инсулина (μ IU/mL, μ E/mL или mU/l), по следната формула - НОМА-IR = Инсулин на гладно x глюкоза /22.5

Използвахме следните статистически методи за оценка на достоверността на получените резултати: дескриптивна статистика; тест на Kolmogorov-Smirnov за проверка на вида на разпределение на данните в групите (Гаусово/не-Гаусово); тест на Shapiro-Wilk за проверка на вида на разпределение на данните при групи с по-малко от 50 лица; Student (t-тест) за сравняване на две независими групи данни; непараметричен тест на Mann-Whitney за сравнение на две независими групи и откриване на статически значима разлика; ANOVA; χ^2 ; корелационен анализ- Spearman (при не-Гаусово) и Pearson (при Гаусово разпределение) и оценка на силата на корелационните коефициенти.

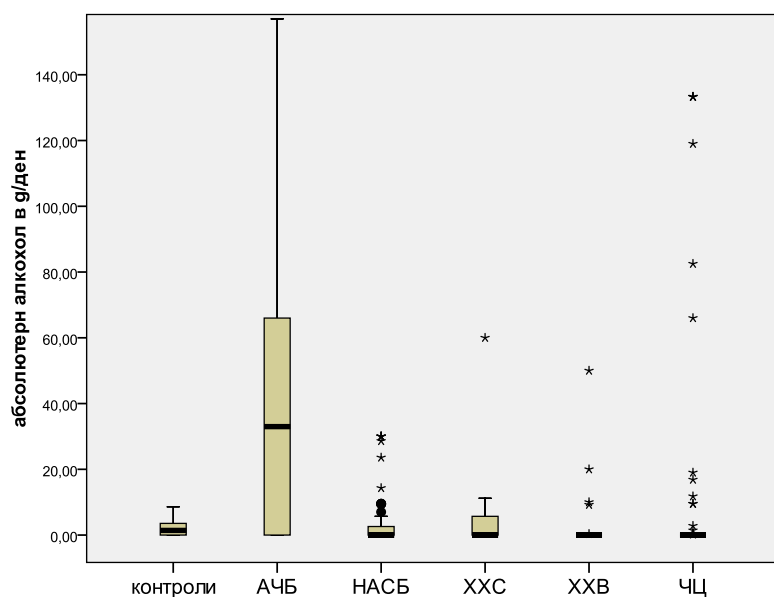
Получените резултати са оценени като статистически достоверни при прагово ниво на значимост $p < 0.05$.

VI. РЕЗУЛТАТИ

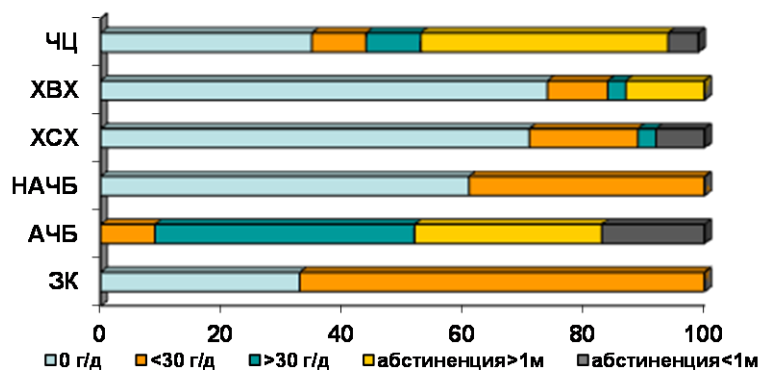
1. Въглехидратно-дефицитен трансферин (CDT%) при ХЧЗ и значението му за определяне на алкохолна злоупотреба и въздържание от алкохол

Оценка на алкохолната консумация по анамнестични данни

Сравнихме анамнестичните данни за алкохолна консумация, представени като дневно количество абсолютен алкохол (g) между всички групи изследвани лица (фиг.3). Дневната алкохолна консумация е най-голяма в групата с алкохолна етиология (АЧБ с или без ЧЦ) в сравнение с всички останали групи ($p=0.0001$). Анамнеза за алкохолна консумация над 30 / 40 g абсолютен алкохол дневно бе също по-честа при АЧБ с и без ЧЦ отколкото в останалите групи ($p=0.0001$), (фиг. 4). 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 3. Дневно количество консумиран абсолютен алкохол (g) в отделните групи изследвани лица



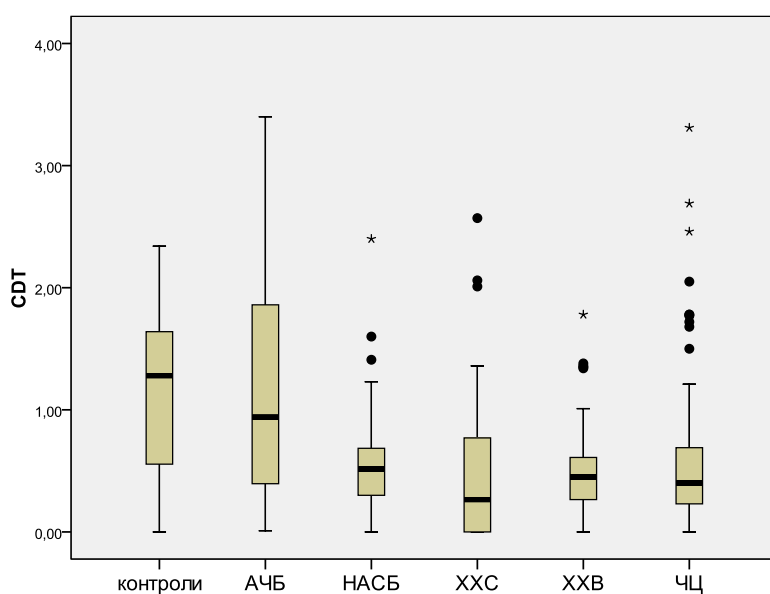
Фигура 4. Характеристика на алкохолната консумация по категории при всички групи изследвани лица

Всички контролни лица и пациентите с НАСБ не приемат абсолютен алкохол над 30 g дневно по анамнестични данни. В групата болни с вирусни хепатити С или В само 4/38 и 6/39 съответно 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 %.

Промени в CDT% при ХЧЗ

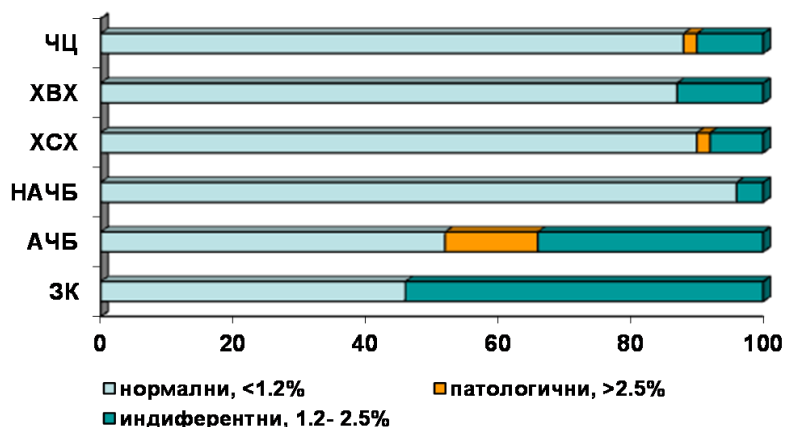
При 327 изследвани от нас лица CDT% бе определен за сметка на дисиалотрансферина. Асиало- и моносиалотрансферин бяха открити само при един пациент с АЧБ с продължаваща алкохолна консумация от 133 g абсолютен алкохол дневно. Съответно дялът им е 0.1% и 2.26%. При нито един от изследваните не установихме генетични варианти в молекулата на CDT.

Стойностите на CDT% в групата на здравите доброволци и тази с ХЧЗ са представени на фигура 5. Средните стойности на CDT% бяха значимо по-високи в групата на АЧБ, сравнени с всички останали групи ($p=0.0001$). Във всички групи стойностите на CDT % бяха по-високи при мъжете в сравнение с тези при жените ($p=0.015-0.003$).



Фигура 5. Стойности на CDT% при всички групи изследвани лица

При 18 от 39 изследвани контролни лица (46%) и при 265 от 289 пациенти с ХЧЗ от всички изследвани групи – 88.6% стойностите на CDT% бяха под 1.2%, което отхвърля значима алкохолна консумация според този показател (фиг. 6). 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 лица от всички изследвани групи – 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 6. 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 дялт на промените (табл.6 и 7).

Таблица 6. Средни стойности на CDT% при болните с с алкохолна и неалкохолна ЧЦ.

		брой	х	Sx	Стан.грешка	Min	Max
CDT	неалкохолна ЧЦ	38	0,5	0,476	0,077	0,0	2,1
	алкохолна	47	0,7	0,737	0,108	0,0	3,3
АСАТ	неалкохолна ЧЦ	38	73,1	45,221	7,336	11,0	217,0
	алкохолна	47	61,9	45,207	6,594	11,0	222,0
ГГТ	неалкохолна ЧЦ	38	172,8	260,031	42,183	14,0	1478,0
	алкохолна	47	304,4	585,625	85,422	21,0	3591,0
МСV	неалкохолна ЧЦ	38	94,6	8,560	1,389	73,0	121,0
	алкохолна	47	98,0	11,002	1,605	74,0	127,0

Таблица 7. Дял на промените в CDT% при болните с алкохолна и неалкохолна ЧЦ.

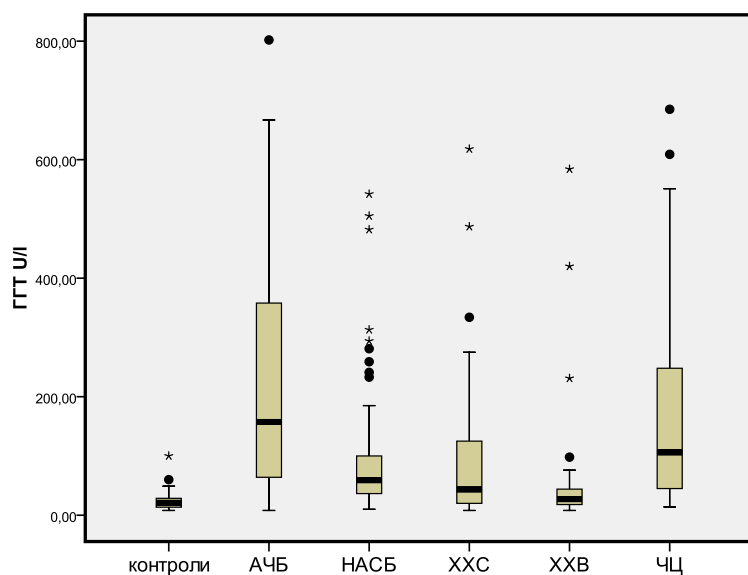
CDT		неалкохолна ЧЦ	алкохолна ЧЦ	общо
нормални стойности	брой	35	40	75
	% CDT	46,7%	53,3%	100,0%
	% групата ЧЦ	92,1%	85,1%	
повишени стойности	брой	0	2	2
	% CDT	0%	100,0%	100,0%
	% групата ЧЦ	0%	4,3%	
индиферентни стойности	брой	3	5	8
	% CDT	37,5%	62,5%	100,0%
	% групата ЧЦ	7,9%	10,6%	
Общо	брой	38	47	85
	% CDT	44,7%	55,3%	100,0%
	% групата ЧЦ	100,0%	100,0%	

Потърсихме връзка между стандартните лабораторни показатели и CDT%. 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 ($r = 0.336/0.293$, $p = 0.03$). Статистическа разлика обаче в CDT% не установихме между болните с нормални и патологични стойности на ГГТ, С-реактивен протеин, албумин или INR/ПВ. Само при болните с ЧЦ доказахме връзка с общи белтък ($r = 0.289$, $p = 0.03$).

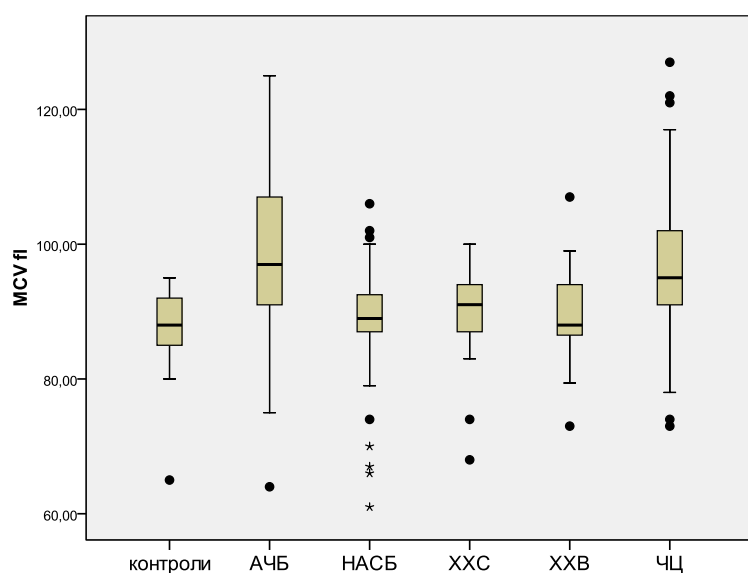
Промени в стандартните индиректни биомаркери за алкохолна консумация при ХЧЗ

Средните стойности на всички стандартни индиректни сурогатни маркери за алкохолна консумация като ГГТ ($p = 0.01$), MCV ($p = 0.05$) и АСТ

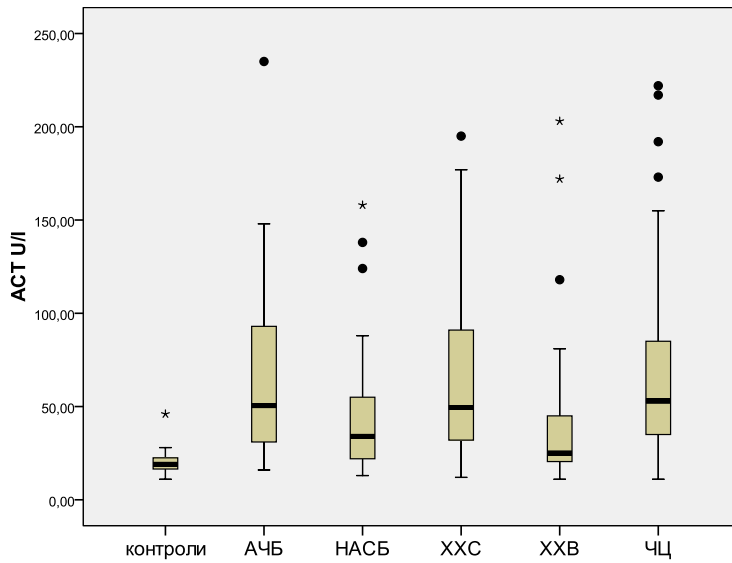
($p=0.001$) бяха по-високи при ХЧЗ в сравнение със здравите контроли (фиг. 7, 8 и 9). При разглеждането на показателите вътре в групата на ХЧЗ се установи, че средните стойности на ГГТ и MCV бяха по-високи при болните с АЧБ в сравнение с НАСБ ($p=0.0001$), ХХС ($p=0.003-0.001$) и ХХВ ($p=0.0001$), а тези на АСТ - при АЧБ в сравнение с НАСБ ($p=0.006$) и ХХВ ($p=0.001$).



Фигура 7. Средни стойности на ГГТ при отделните групи изследвани лица

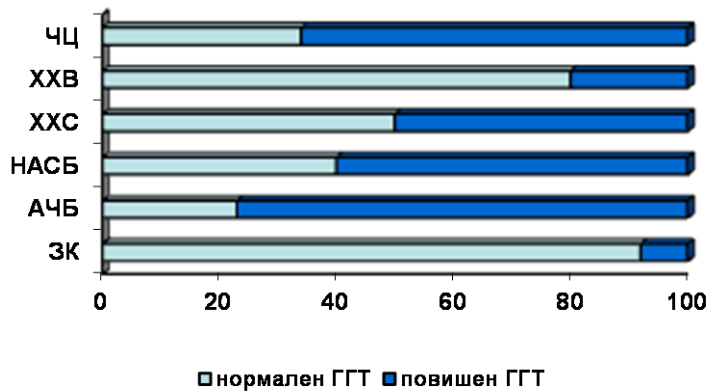


Фигура 8. Средни стойности на MCV при отделните групи изследвани лица

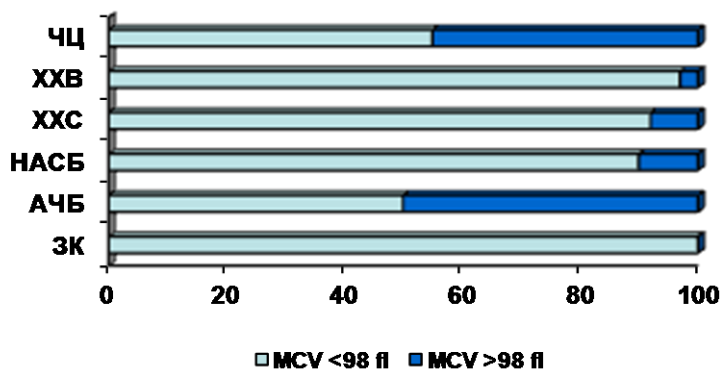


Фигура 9. Средни стойности на АСТ при отделните групи изследвани лица

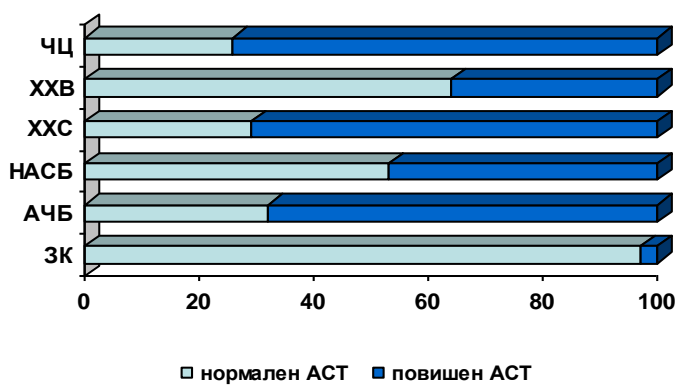
Дялът на повишение на ГГТ, MCV, АСТ и АСТ/АЛТ отношението показва също значима разлика между отделните групи ($p=0.002 - 0.0001$), (фиг. 10-13).



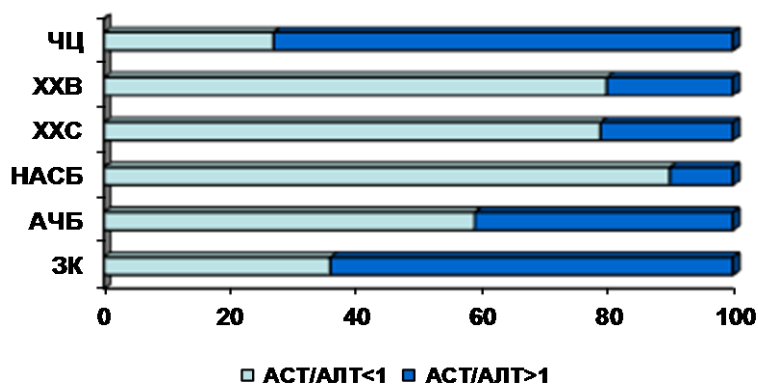
Фигура 10. Дял на повишени и нормални стойности на ГГТ при отделните групи изследвани лица



Фигура 11. Дял на повишени и нормални стойности на MCV при отделните групи изследвани лица



Фигура 12. Дял на повишени и нормални стойности на АСТ при отделните групи изследвани лица



Фигура 13. Дял на отношението АСТ/АЛТ над 1 при отделните групи изследвани лица

Не установихме статистически значими разлики в средните стойности на ГГТ; MCV и АСТ сред болните с ЧЦ с алкохолна и неалкохолна (вирусна) етиология (табл. I.2), както и между болните с компенсирани и декомпенсирана цироза (табл.8).

Таблица 8. Средни стойности на ГГТ, MCV и АСТ при болните с компенсирани и декомпенсирана ЧЦ.

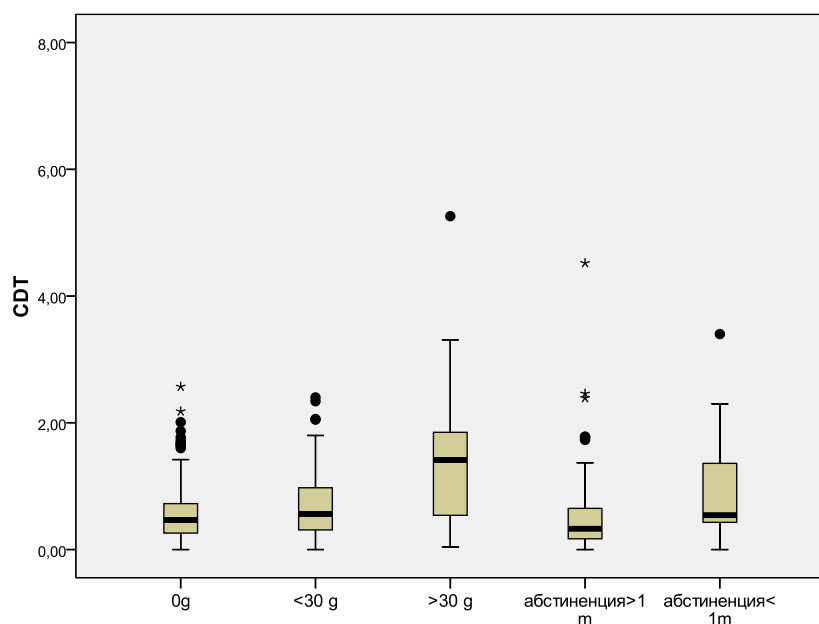
		брой	X	Sx	Min	Max
CDT	компенсирана ЧЦ	44	0,7	0,69	0	3,3
	декомпенсирана ЧЦ	44	0,5	0,56	0	2,5
АСАТ	компенсирана ЧЦ	44	68,8	44,19	11	217
	декомпенсирана ЧЦ	43	62,1	41,65	11	222
ГГТ	компенсирана ЧЦ	44	203,0	323,11	14	1876
	декомпенсирана ЧЦ	41	181,1	179,74	16	685
MCV	компенсирана ЧЦ	43	94,9	7,90	74	111
	декомпенсирана ЧЦ	41	97,9	11,78	73	138

Честотата на отклонение на ГГТ > 55 IU/l бе 70.2% с/у 60.5, на MCV > 98 - 51.1% с/у 36.8%, на АСТ > 35 IU/l – 72.3% с/у 76.3% и на отношението АСТ/АЛТ - 78.9% с/у 60.7% съответно сред болните с алкохолна и неалкохолна ЧЦ. Разликите са статистически незначими.

Връзка между анамнестичните данни и промените в сурогатните биомаркери за алкохолна консумация

Потърсихме връзка между анамнестичните данни за алкохолната консумация, представени като количество приет абсолютен алкохол дневно и промените при 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 ($r = 0.154$, $p = 0.05$).

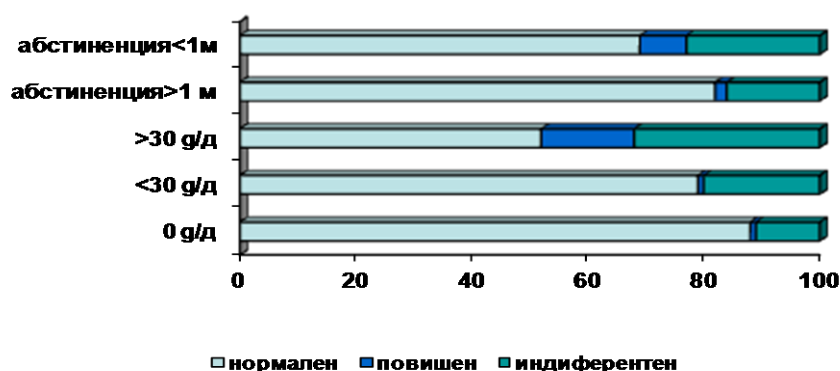
Най-високите стойности на CDT% установихме при прием на абсолютен алкохол над 30 g дневно в сравнение с другите категории ($p = 0.0001$), (фиг. 14). Стойностите на CDT% при абстиненция над 1 месец са по-ниски не само спрямо тези при значима алкохолна консумация, но и спрямо консумация на абсолютен алкохол под 30 g /ден ($p = 0.024$). По-високо е и консумираното количество абсолюден 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% ($p = 0.019$), (табл. 9). На фигура 15 са представени промените в стойностите на CDT% според анамнестичните данни за консумираното количество абсолюден алкохол дневно по категории. 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 ($n = 61$).



Фигура 14. Стойности на CDT% според ежедневния прием на абсолютен алкохол

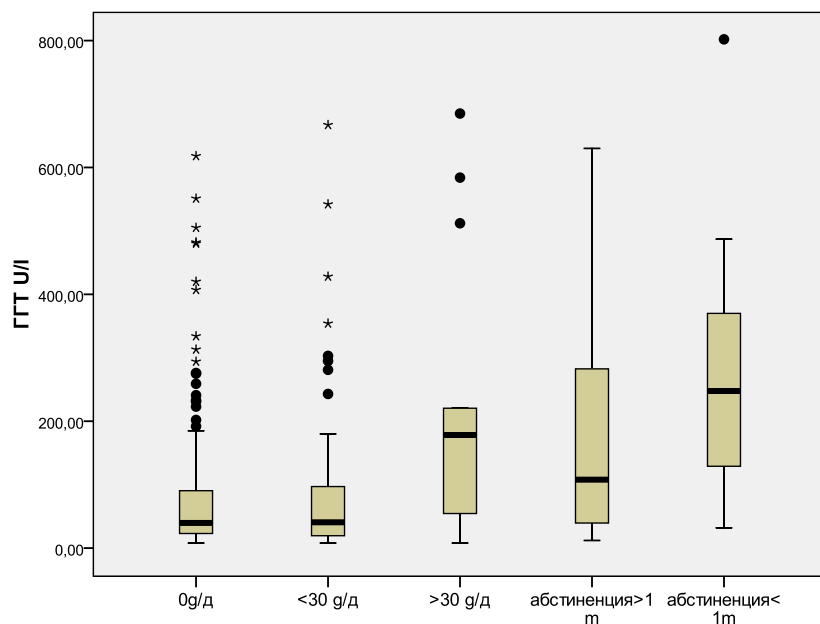
Таблица 9. Консумираното количество абсолютен алкохол дневно и ГГТ по анамнестични данни според промените в стойностите на CDT%.

Група	CDT	брой	х	Sx	Min	Max
ГГТ	нормален	266	140,5	297,376	8,0	3591,0
	повишен	8	439,5	875,958	24,0	2594,0
	индиферентен	52	112,9	159,563	8,0	630,0
MCV	нормален	265	91,9	9,105	61,0	127,0
	повишен	8	95,4	13,384	75,0	111,0
	индиферентен	52	91,7	8,987	65,0	125,0
абсолютен алкохол	нормален	266	10,2	47,252	0,0	571,4
	повишен	8	66,9	63,316	0,0	157,0
	индиферентен	53	26,0	78,887	0,0	533,3

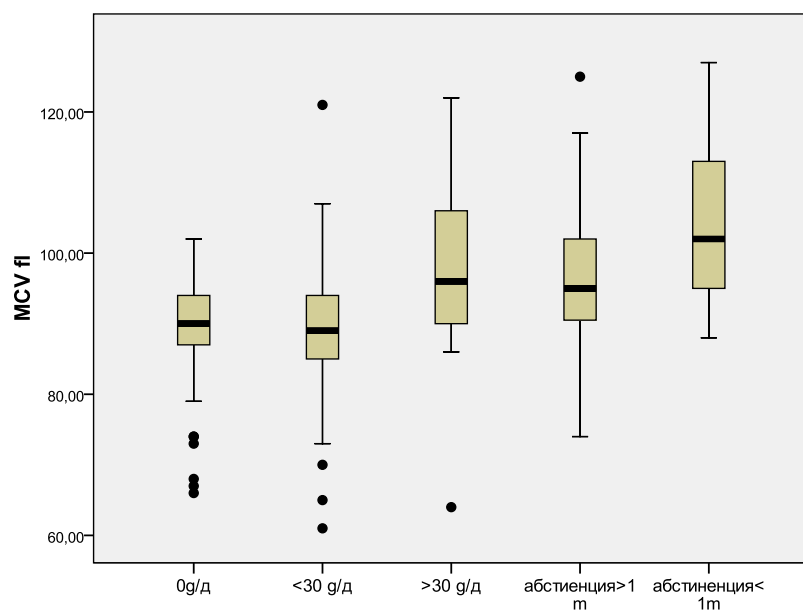


Фигура 15. Промени в стойностите на CDT% според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории

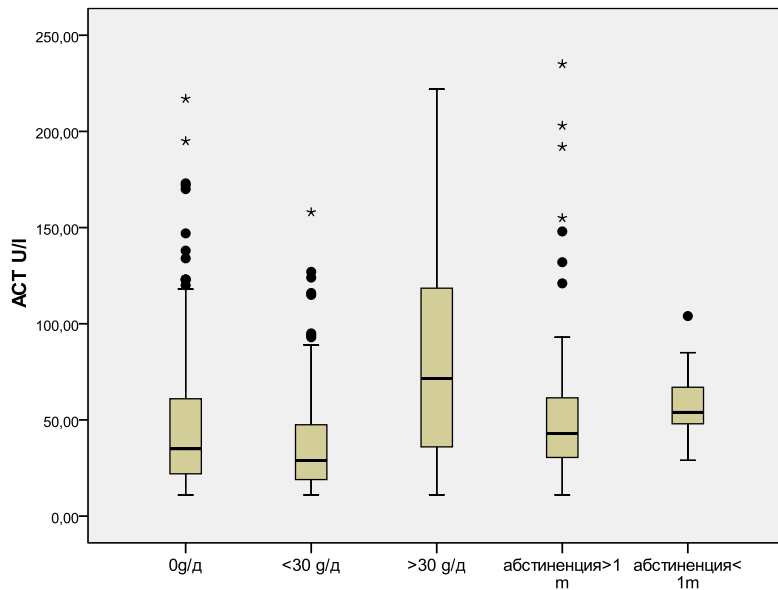
Средните стойности на стандартните индиректни маркери за алкохолна консумация ГГТ, MCV и АСТ показаха също значими разлики между отделните групи ($p=0.0001$), (фиг. 16, 17 и 18). По-високи стойности на тези показатели установихме при прием на абсолютен алкохол над 30 g дневно (спрямо 0 g/д, $p=0.004$ за АСТ и $p=0.0001$ за ГГТ и MCV; спрямо < 30 g/д, $p=0.001$), както и при абстиненция под или над 1 месец (за ГГТ - 0 g/д с/у абстиненция < 1 м, $p=0.0001$ и < 30 g/д с/у абстиненция \geq 1 м, $p=0.0001$; за MCV - 0 g/д с/у абстиненция < 1 м, $p=0.0001$, < 30 g/д с/у абстиненция < 1 м, $p=0.0001$ и \geq 1 м, $p=0.002$; за АСТ - 0 g/д с/у абстиненция < 1 м, $p=0.019$, < 30 g/д с/у абстиненция < 1 м или \geq 1 м, $p=0.002$). По-висок е и дялът на повишени стойности при последните три категории (фиг. 19, 20 и 21). Най-рядко наблюдавахме промени в MCV в сравнение с ГГТ и АСТ при лицата без или с малка алкохолна консумация.



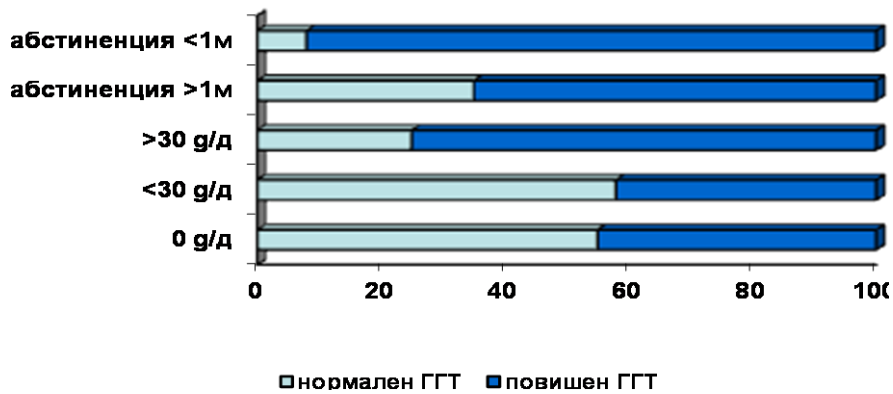
Фигура 16. Средни стойности на ГГТ според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории



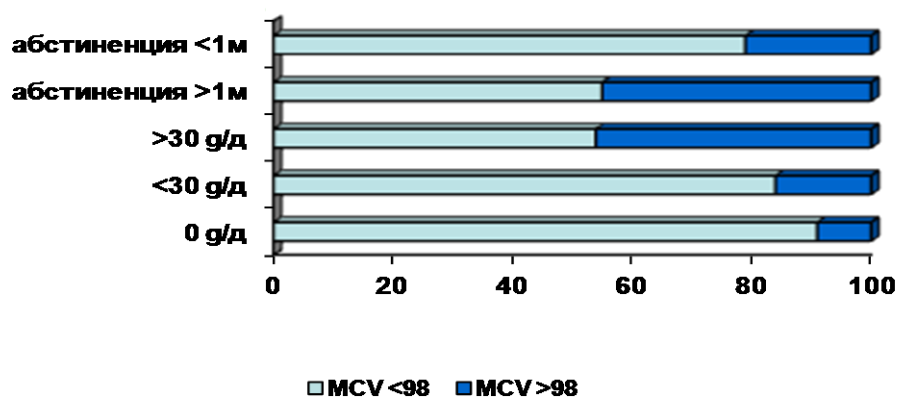
Фигура 17. Средни стойности на MCV според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории



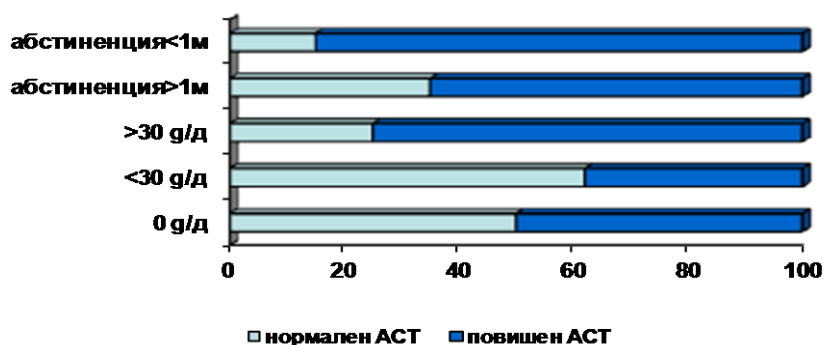
Фигура 18. Средни стойности на АСТ според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории



Фигура 19. Промени в стойностите на ГГТ според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории



Фигура 20. Промени в стойностите на MCV според анамнестичните данни за консумираното количество абсолютен алкохол дневно по категории



Фигура 21. 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

Много параметри са оценявани като сурогатни маркери за неинвазивна оценка на клетъчната смърт при НАСБ включително СК 18. Ние характеризирахме и сравнихме промените в серумния СК30 при 83 лица с НАСБ, болни с хронични вирусни хепатити В и С, и контролни здрави лица, а по-малко специфичния за апоптоза СК65 - при 41 болни с НАСБ и ХХС.

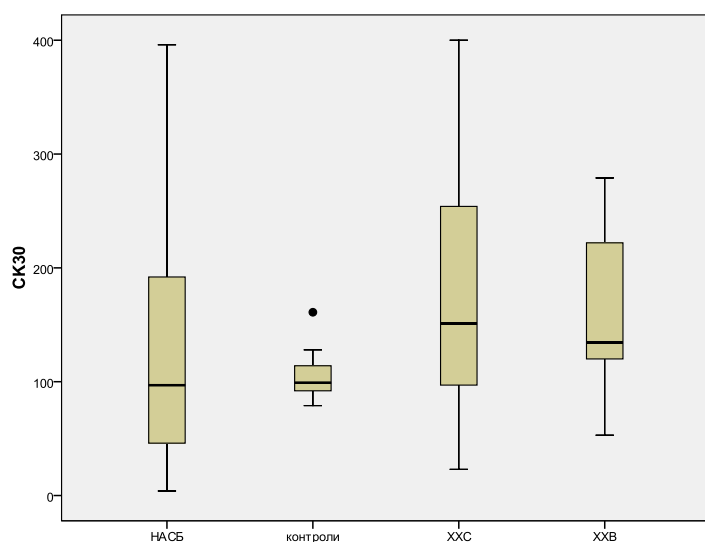
Стойностите на СК 30 при болните с ХЧЗ и контролите са представени на таблици 10 и 11 и фигура 24.

Таблица 10. Стойности на СК18-М30 при контролни лица и ХЧЗ.

	Контроли	ХЧЗ
x	103,75	201,14
Медиана	99	131
Мода	90 ^a	1000
Sx	18,934	229,429
Min	79	0
Max	161	1000
95th перцентил	159.3	955.6

Таблица 11. Стойности на СК18-М30 при групите ХЧЗ.

	НАСБ	ХХС	ХХВ
x	147.65	231,62	220,68
Медиана	66,50	151,00	134,50
Мода	0 ^a	23 ^a	143
Sx	223,678	243,034	223,232
Min	0	23	53
Max	1000	1000	1000



Фигура 24. 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 сравняване на резултатите между болните с НАСБ, ХХС и ХХВ. Стойности на СК30 над приетия “cut off” 260 U/l установихме само в 13% ($n=11$) от цялата група изследвани лица или 18 % от всички случаи с чернодробно заболяване – 2 НАСБ (НАСХ с фиброза), 5 ХХС и 4 ХХВ ($p=0.0045$). В 3 случая намерихме стойности $> 1\ 000$ U/L (1 НАСБ, 1 ХХС и 1 ХХВ). При всички контролни здрави лица стойностите бяха под 260 U/l. Получената стойност при здравите контроли за 95th перцентил бе 159.3 U/L. Поради малкия брой болни в отделните групи ХЧЗ не доказахме статистическа разлика според разпределението под и над cut off (табл.12).

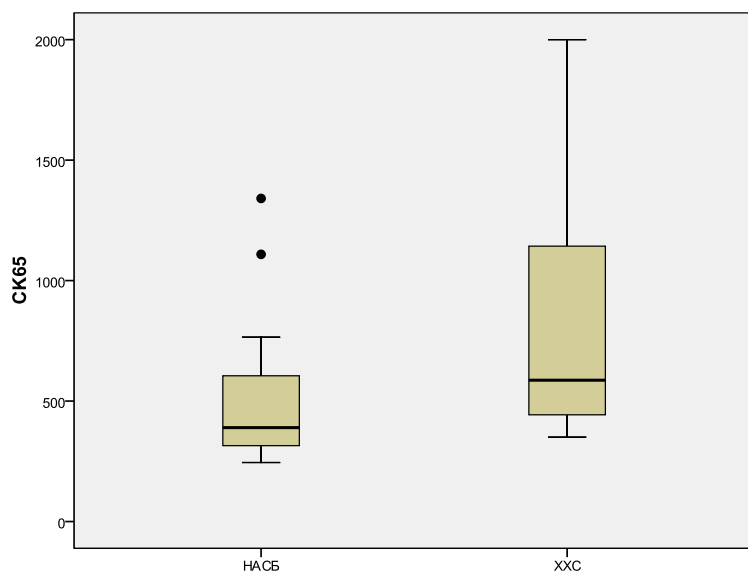
Таблица 12. Разпределение на стойностите на СК30 под и над 260 U/l при болните с ХЧЗ и контроли.

М30			НАСБ	контроли	ХХС	ХХВ	общо
	<260 U/l	брой	18	20	16	18	72
		% М30	25%	28%	22%	25%	100%
		% <i>групата</i>	90%	100%	76%	82%	
	>=260 U/l	брой	2	0	5	4	11
		% М30	18%	0%	46%	36%	100%
		% <i>групата</i>	10%	0%	24%	18%	
общо		брой	20	20	21	22	83
		% М30	24%	24%	25%	26%	100%
		% <i>групата</i>	100%	100%	100%	100%	

Стойностите на СК65 при болните с НАСБ и ХХС са отразени на таблица 13 и фигура 25.

Таблица 13. Стойности на СК18-М65 при НАСБ и ХХС.

	НАСБ	ХХС
X	501,35	818,48
Медиана	389	587
Мода	245 ^a	418
Sx	289,539	487,480
Min	245	350
Max	1341	2000



Фигура 25. Средни стойности на СК65 при НАСБ и ХХС

При сравняване на СК65 при изследваните две групи болни с ХЧЗ установихме по-високи стойностите при пациентите с ХХС в сравнение с тези с НАСБ ($p=0.008$). При 65,8% от изследваните болни ($n=27$) установихме стойности на СК65 над “cut off” 413 U/L, по-често при болните с ХХС– 18 ХХС срещу 9 НАСБ ($p= 0.009$), (табл.14). При двама от болните с НАСБ се касаеше само за НАС. При един пациент с ХХС се установи стойност >2000 U/L.

Таблица 14. Разпределение на стойностите на СК65 под и над 413 U/l при болните с НАСБ и ХХС.

M65			НАСБ	ХХС	общо
<413 U/l	брой		11	3	14
	% M65		79%	21%	100%
	% групата		55%	14%	
≥413 U/l	брой		9	18	27
	% M65		33%	67%	100%
	% групата		45	85,71428571	
общо	брой		20	21	41
	% M65		49%	51%	100%
	% групата		100%	100%	

Не установихме възрастови и полови на различия, както за М30, така и за М65 при изследваните лица.

Стойностите на аминотрансферазите и ГГТ при изследваните лица са представени на таблица 15.

Таблица 15. Стойности на АСАТ, АЛАТ и ГГТ при контролните лица и болните с НАСБ, ХХС и ХХВ.

	Контроли			НАСБ			ХХС			ХХВ		
	АСАТ	АЛАТ	ГГТ	АСАТ	АЛАТ	ГГТ	АСАТ	АЛАТ	ГГТ	АСАТ	АЛАТ	ГГТ
X	19,0	19,2	25,4	41,7	81,3	83,4	63,4	102,1	93,4	45,7	85,8	58,1
Медиана	19	16,5	24,5	40,5	91	64	51	78	51	30	38	27,5
Мода	19	11	26	37 ^a	20 ^a	24 ^a	21 ^a	29 ^a	20	17 ^a	38	16 ^a
Sx	4,6	9,0	11,7	15,9	36,8	59,6	40,7	71,1	140	39,6	118,0	93,6
Min	11	8	8	18	20	24	12	7	8	15	12	8
Max	27	37	59	82	144	241	170	258	618	172	488	420

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 биомаркер корелираше само с АСТ при болните с НАСБ. При здравите лица СК30 показва 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 ($r=0.710$, $p=0.0001$).

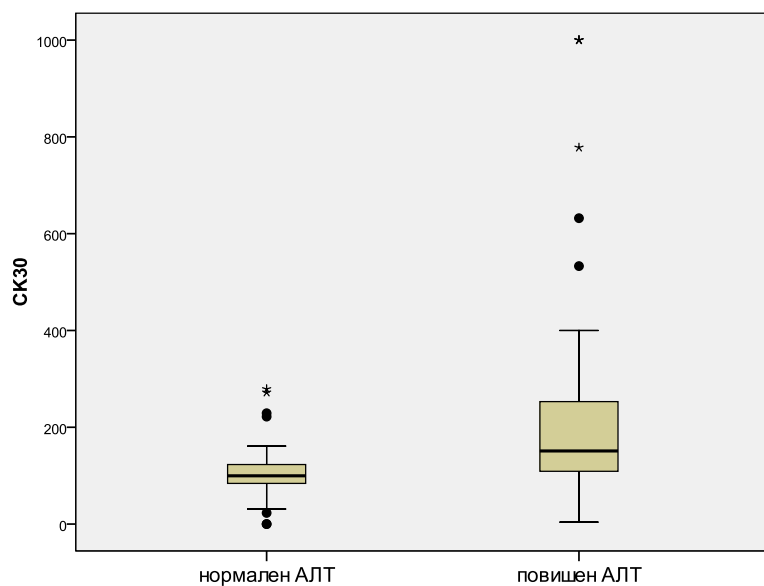
Таблица 16. Корелационни зависимости на СК30 и СК65 при ХЧЗ и контролни здрави лица.

параметър	СК30		СК65	
	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

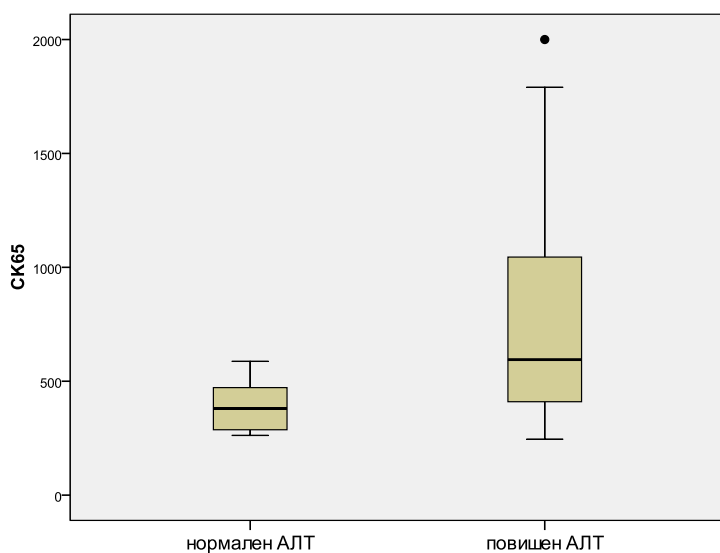
параметър	СК30		СК65	
	Корелационен коэффициент	p	Корелационен коэффициент	p
НАСБ				
АСАТ	0.530	0.033	0.682	0.002
ГГТ	0.508	0.031		
ХХС				
АСАТ	0.506	0.019	0.670	0.001
АЛАТ	0.658	0.001	0.772	0.001
ГГТ	0.532	0.016	0.618	0.004
ИТМ	0.460	0.048		
ХХВ				
АСАТ	0.523	0.012		
АЛАТ	0.467	0.028		
ГГТ	0.718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

По-високи средни стойности на СК30 се установиха в групата на ХЧЗ с повишени стойности на АЛТ спрямо тези с нормални ($p=0.001$), (фиг.26). В отделните групи- НАСБ, ХХС и ХХВ, също се установиха разлики между болните с нормални и повишени АЛТ, но без статистическа значимост. Това най-вероятно е свързано с малкия брой включени лица в групите.



Фигура 26. Средни стойности на СК30 при нормални и повишени стойности на АЛТ

Аналогични данни получихме за СК65 - по-високи при случаите с повишен АЛТ за изследваните лица с НАСБ и ХХС ($p=0.014$), (фиг. 27).



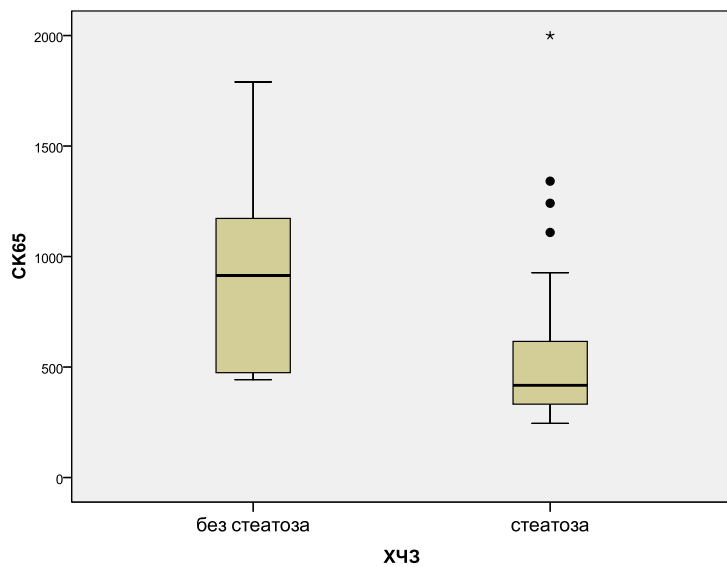
Фигура 27. Средни стойности на СК65 при нормални и повишени стойности на АЛТ

В дяловото разпределение СК65 над cut off стойността се среща в 100% от случаите без стеатоза т.е. при болните с ХХС и ХХВ и само в 53.3% от случаите със стеатоза ($p=0.004$), (табл. 18).

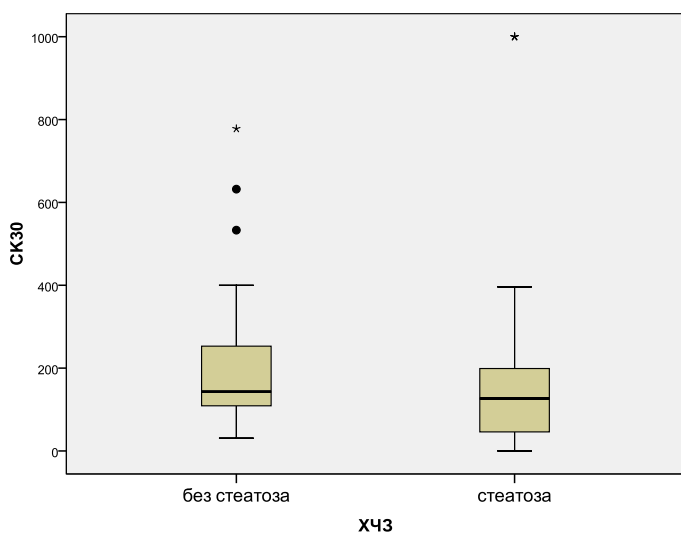
Таблица 18. Честота на повишение на СК65 над 413 U/l според хистологичните белези за стеатоза при ХЧЗ.

	ХЧЗ	без стеатоза	със стеатоза	общо
СК65<413	брой	0	14	14
	% в групата СК65	,0%	100,0%	100,0%
	% в групата стеатоза	,0%	46,7%	34,1%
СК65>413	брой	11	16	27
	% в групата СК65	40,7%	59,3%	100,0%
	% в групата стеатоза	100,0%	53,3%	65,9%
	общо	11	30	41
		26,8%	73,2%	100,0%
		100,0%	100,0%	100,0%

Средните стойности на СК65 за болните без стеатоза са по-високи в сравнение с тези със стеатоза ($p=0.010$), (фиг. 28). Такава разлика за средните нива на СК30 не установихме (фиг.29). Не установихме разлика за СК65 и за СК30 и между групите с лека, умерена и изрзена стеатоза.

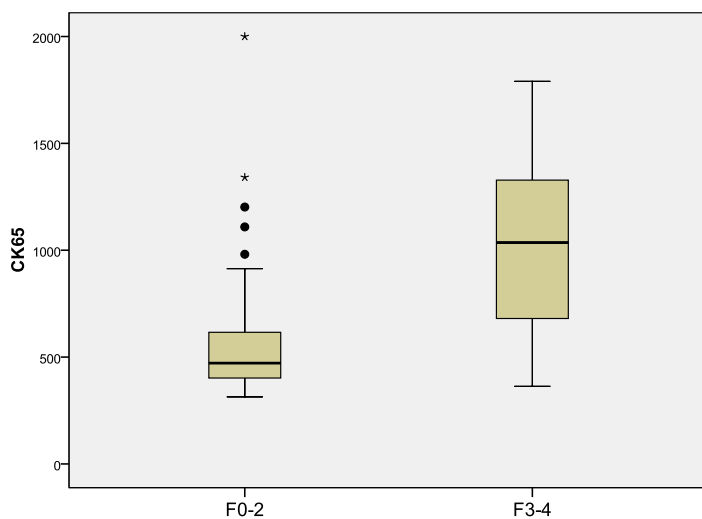
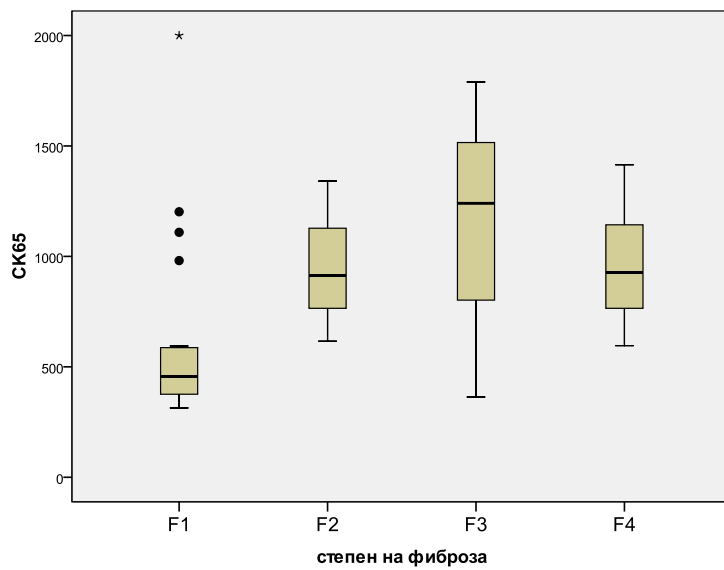


Фигура 28. Средни стойности на СК65 при ХЧЗ с и без стеатоза



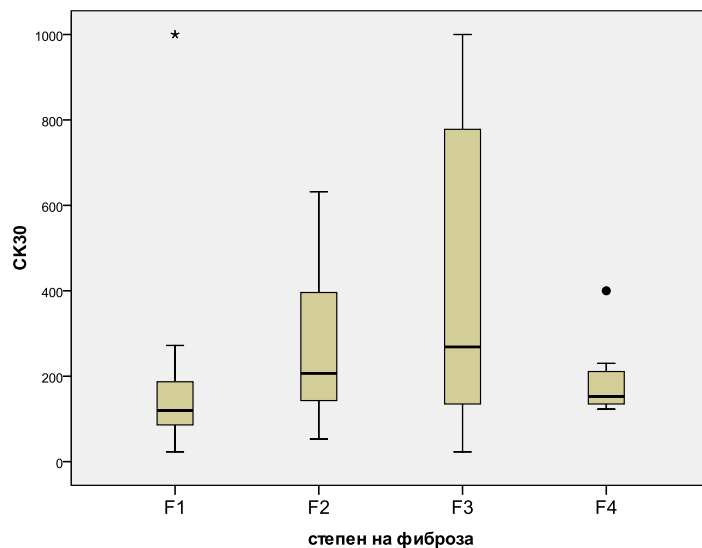
Фигура 29. Средни стойности на СК30 при ХЧЗ с и без стеатоза

Корелационни връзки установихме за: СК30 и хистологичната активност ($p=0.030$, $r=0.293$), СК30 и степента на фиброза ($p=0.070$, $r=0.361$), СК65 и 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.30 а и б). Без разлика на разпределението над и под кът оф според степента на фиброза.



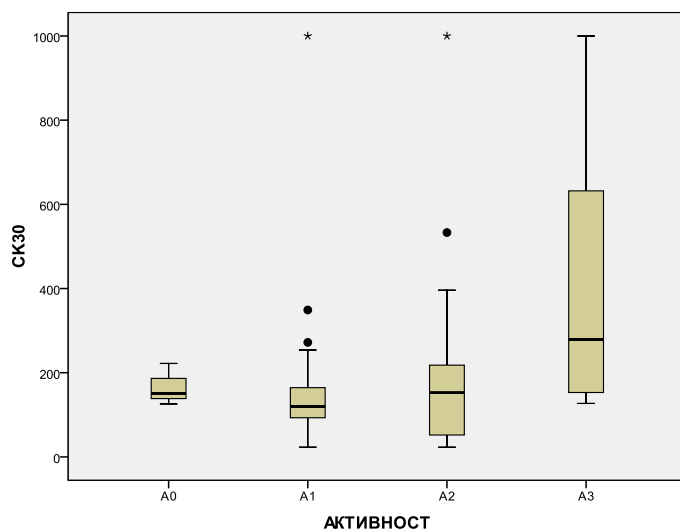
Фигура.30. Средни стойности на СК65 според степента на фиброза при ХЧЗ (а и б)

Аналогични данни получихме за СК30 - по-високи стойности за F2 спрямо F1 ($p=0.016$), (фиг.31).

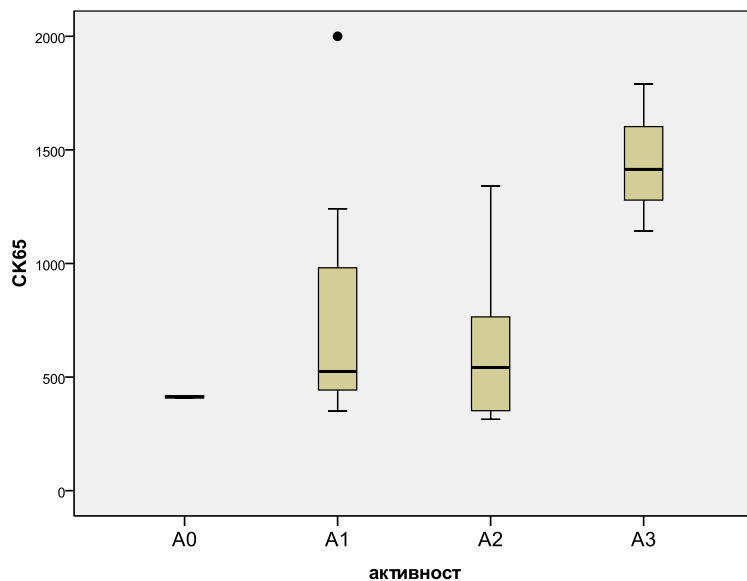


Фигура.31. Средни стойности на СК30 според степента на фиброза при ХЧЗ

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. 32 и 33).



Фигура.32. Средни стойности на СК30 според степента на активност при ХЧЗ



Фигура.33. 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 гранично възпаление и стеатоза (липса на достатъчно критерии за диагноза 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(ОН) витамин Д₃ при ХЧЗ

Изследвахме промените в плазмените нива на 25(ОН) витамин Д₃ (витамин Д) при различни ХЧЗ (n=288) и сравнихме получените резултати с тези на 36 контролни здрави лица и между изследваните групи ХЧЗ.

Получените резултати класифицирахме 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

След това при обработката на данните допълнително се разгледаха резултатите и според две основни групи – недостатъчност (включваща дефицита, изразената и леката недостатъчност) и достатъчност. При нито едно от пациентите не установихме ниво на витамин Д над 320 nmol/l.

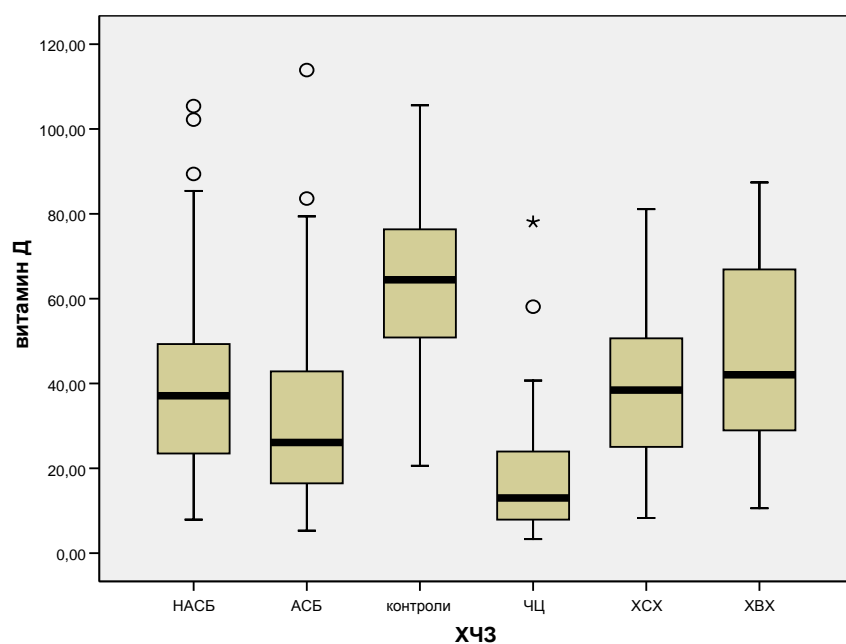
Средните стойности на витамин Д в плазмата при контролите бяха значимо по-високи отколкото тези на ХЧЗ ($p=0.0001$), както и спрямо отделните групи ХЧЗ ($p=0.0001$) (табл.19 и 20, фиг. 34). Сравняване на резултатите между групите с чернодорбни заболявания показва значима разлика само между АЧБ и ХХВ ($p=0.007$). Тенденция за по-ниски стойности при болните с АЧБ спрямо болните с НАСБ ($p=0.051$). Средните стойности на витамин Д бяха значимо по-ниски при болните с напреднала фиброза F4 (начална цироза) в сравнение с останалите стадии на фиброза при болните с ХЧЗ, вкл. тези с вирусна етиология- ХХС и ХХВ ($p=0.0001$), (табл. 21).

Таблица 19. Средни стойности на витамин Д в плазмата при изследваните здрави контроли и болни с ХЧЗ.

	ХЧЗ	контроли
брой	288	36
x	34,44	63,99
Медиана	30,75	64,45
Sx	21,976	18,467
Min	3,3	20,6
Max	113,9	105,6

Таблица 20. Средни стойности на витамин Д в плазмата при изследваните групите болни с ХЧЗ.

	брой	х	Sx	Станд. грешка	Min	Max
НАСБ	117	39,6	20,495	1,895	8	105
АЧБ	32	34,2	25,299	4,472	5	114
ЧЦ	71	17,6	13,553	1,608	3	78
ХХС	32	39,1	18,385	3,250	8	81
ХХВ	36	47,0	22,055	3,676	11	87

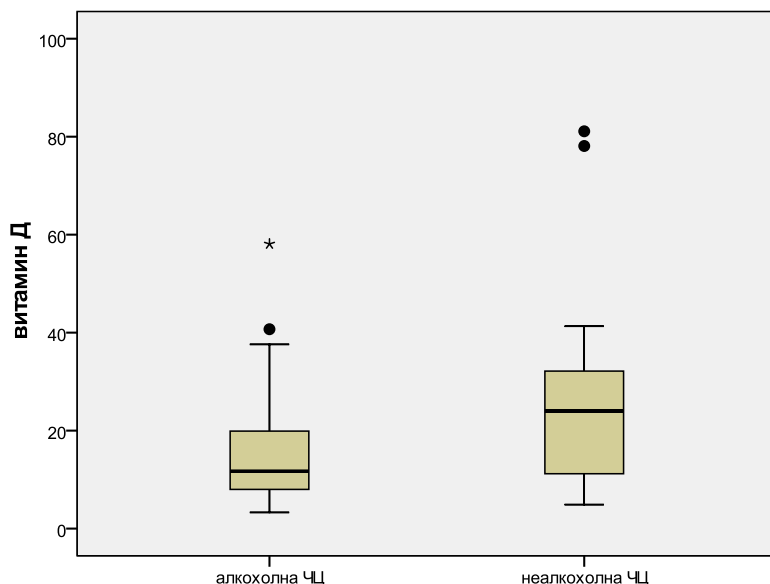


Фигура 34. Средни стойности на витамин Д в групите ХЧЗ и контроли

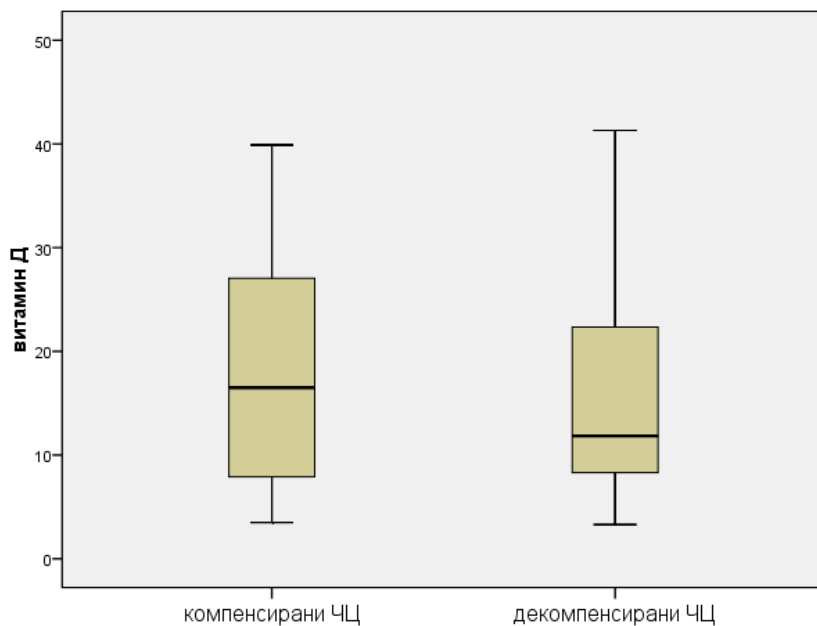
Таблица 21. Средни стойности на витамин Д според степента на фиброза при групите ХЧЗ.

	брой	х	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

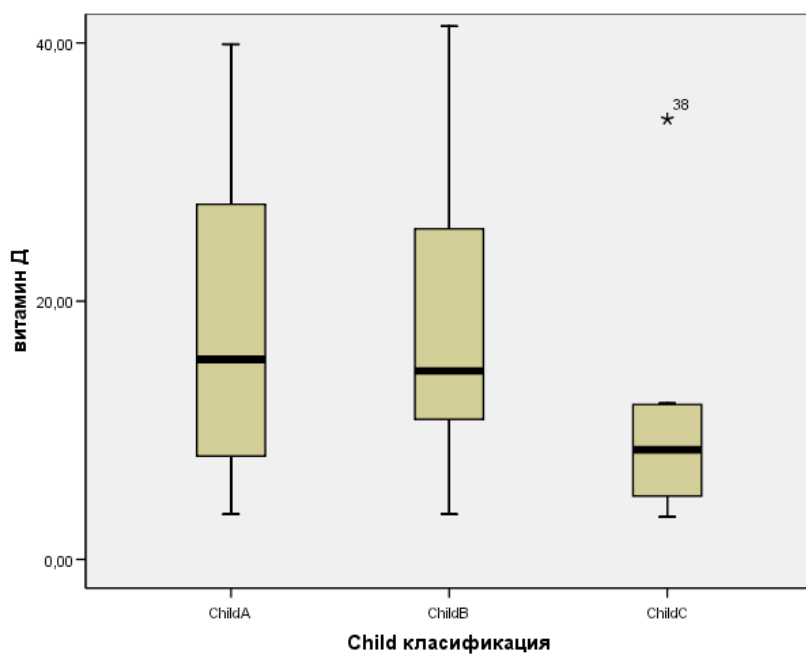
Най-ниски стойности установихме при болните с ЧЦ в сравнение с болните без цирроза ($p=0.0001$), вкл. спрямо НАСБ ($p=0.0001$), АЧБ ($p=0.001$), ХХВ ($p=0.0001$) и ХХС ($p=0.0001$), както и спрямо контролните лица ($p=0.0001$). По-ниски бяха и стойностите при алкохолна етиология спрямо нелакохолна ($p=0.005$), (фиг. 35). Не намерихме статистическа разлика в нивата на витамин Д между цирозите с В и С вирусна етиология. Плазмените нива бяха по-ниски при декомпенсираните срещу компенсирани болни с ЧЦ ($p=0.005$), както и при болните с Child C спрямо Child B и Child A ($p=0.005$), (фиг. 36, фиг. 37).



Фигура 35. Средни стойности на витамин Д в при пациентите с алкохолна и неалкохолна ЧЦ



Фигура 36. Средни стойности на витамин Д при пациентите с компенсирани и декомпенсирани ЧЦ



Фигура 37. Средни стойности на витамин Д при пациентите с ЧЦ според Child-Pugh класификацията

Анализът на получените резултати показва, че повечето от изследваните лица в групата с ХЧЗ са с различна степен на недостатъчност (от дефицит до недостатъчност) на витамин Д - 96,5% (табл. 22). Здравите контроли показаха по-рядко от ХЧЗ недостатъчност - в 77,8% ($p=0.005$), ($p=0.0001$). Подробната характеристика на степента на дефицита е представена на таблица 23. В контролната група най-често наблюдавахме лека недостатъчност, докато при болните с ХЧЗ отчетохме еднакъв дял на пациентите с дефицити и изразена недостатъчност ($p=0.0001$).

Таблица 22. Промени в плазмените нива на витамин Д по категории при всички изследвани лица.

Група		недостатъчност	Достатъчност	общо
ХЧЗ	брой	278	10	288
	% групата	96,5%	3,5%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	90,8%	55,6%	
контролни	брой	28	8	36
	% групата	77,8%	22,2%	100
	% недостатъчност/достатъчност	9,2%	44,4%	
общо	брой	306	18	324
	% групата	94,4%	5,6%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	100%	100%	

Таблица 23. Промени в плазмените нива на витамин Д по степен на дефицит при всички изследвани лица (ХЧЗ и здрави контроли).

дефицит/токсичност		ХЧЗ	контроли	общо
дефицит	брой	113	1	114
	% дефицит/токсичност	99,1%	0,9%	100%
	% <i>групата</i>	39,1%	2,8%	
изразена недостатъчност	брой	118	6	124
	% дефицит/токсичност	95,2%	4,8%	100%
	% <i>групата</i>	40,9%	16,7%	
лека недостатъчност	брой	47	21	68
	% дефицит/токсичност	69,2%	30,8%	100%
	% <i>групата</i>	16,5%	58,3%	
достатъчност	брой	10	8	18
	% дефицит/токсичност	55,6%	44,4%	100%
	% <i>групата</i>	3,5%	22,2%	
общо	брой	288	36	324
	% дефицит/токсичност	88,9%	11,1%	100%
	% <i>групата</i>	100%	100%	

Степента на недостатъчност при болните с прециротични хронични чернодорбни заболявания е приблизително еднакъв- от 89% до 97% (табл. 24). Всички болни с чернодорбна цироза показаха недостатъчност в 100%. Разликите са статистически значими ($p=0.0001$).

Таблица 24. Промени в плазмените нива на витамин Д по категории в отделните групи болни с ХЧЗ и контроли.

Група		недостатъчност	достатъчност	общо
НАСБ	брой	112	3	115
	% <i>групата</i>	97,4%	2,6%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	36,6%	16,6%	
АЧБ	брой	30	2	32
	% <i>групата</i>	93,7%	6,3%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	9,8%	11,1%	
контроли	брой	28	8	36
	% <i>групата</i>	77,8%	22,2%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	9,1%	44,4%	
ЧЦ	брой	71	0	71
	% <i>групата</i>	100%	%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	23,90%	0%	
ХХС	брой	31	1	32
	% <i>групата</i>	96,9%	3,1%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	10,1%	5,6%	
ХХВ	брой	32	4	36
	% <i>групата</i>	88,9%	11,1%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	10,5%	22,3%	
общо	брой	306	18	324
	% <i>групата</i>	94,5%	5,5%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	100%	100%	

При болните НАСБ, ХХВ и ХХС най-често установихме изразена недостатъчност, последвана с относително еднакви дялове на дефицит и лека недостатъчност (табл. 25). 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. Разликите са статистически значими ($p=0.0001$).

Таблица 25. Промени в плазмените нива на витамин Д по степен на дефицит в групите с отделни ХЧЗ и контроли.

дефицит/токсичност		НАСБ	АЧБ	контроли	ЧЦ	ХХС	ХХВ	общо
Дефицит	Брой	30	14	1	57	8	4	114
	% дефицит/токсичност	26,3%	12,3%	0,9%	5%	7%	3,5%	100%
	% <i>групата</i>	26,1%	43,7%	2,8%	78,1%	25%	11,1%	
изразена недостатъчност	Брой	58	12	6	14	15	19	124
	% дефицит/токсичност	46,7%	9,7%	4,8%	11,3%	12,2%	15,3%	100%
	% <i>групата</i>	50,4%	37,5%	16,7%	19,3%	46,8%	52,8%	
лека недостатъчност	Брой	24	4	21	2	8	9	68
	% дефицит/токсичност	35%	5,9%	30,9%	2,9%	11,8%	13,2%	100%
	% <i>групата</i>	20,8%	12,5%	58,3%	2,7%	25%	25%	
достатъчност	Брой	3	2	8	0	1	4	18
	% дефицит/токсичност	16,7%	11,1%	44,4%	0%	5,6%	22,2%	100%
	% <i>групата</i>	2,7%	6,25%	22,2%	0%	3,2%	11,1%	
Общо	Брой	115	32	36	73	32	36	324
	% дефицит/токсичност	35,5%	9,9%	11,1%	22,5%	9,9%	11,1%	100%
	% <i>групата</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

При болните с ЧЦ недостатъчността и степента 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 (табл. 26, табл. 27, табл. 27).

Таблица 26. Промени в плазмените нива на витамин Д по категории при болните с алкохолна и неалкохолна ЧЦ.

Група		Недостатъчнос	достатъчнос	общо
		г	г	
алкохолна ЧЦ	брой	51	0	51
	<i>% групата</i>	100%	0%	100%
	%недостатъчнос/достатъчнос г	63,7%	0%	
неалкохолна ЧЦ	брой	29	1	30
	<i>% групата</i>	96,7%	3,3%	100%
	%недостатъчнос/достатъчнос г	36,3%	100%	
общо	брой	80	1	81
	<i>% групата</i>	98,2%	1,2%	100%
	%недостатъчнос/достатъчнос г	100%	100%	

Таблица 27. Промени в плазмените нива на витамин Д по категории при болните с декомпенсирана и компенсирана ЧЦ.

Група		недостатъчнос	достатъчнос	общо
		г	г	
компенсирана ЧЦ	брой	38	1	39
	<i>% групата</i>	97,40%	2,60%	100%
	% недостатъчнос/достатъчнос	50%	100%	
декомпенсирана ЧЦ	брой	38	0	38
	<i>% групата</i>	100%	0%	100%
	% недостатъчнос/достатъчнос	50%	0%	
Общо	брой	76	1	77
	<i>% групата</i>	98,70%	1,30%	100%
	% недостатъчнос/достатъчнос	100%	100%	

Таблица 28. Промени в плазмените нива на витамин Д по категории при болните с ЧЦ според степента на Child класификацията.

Група		недостатъчност	достатъчност	общо
ChildA	брой	40	1	41
	% <i>групата</i>	97,60%	2,40%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	50%	100	
ChildB	брой	29	0	29
	% <i>групата</i>	100%	0%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	36,30%	0%	
ChildC	брой	11	0	11
	% <i>групата</i>	100%	0%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	13,70%	0%	
общо	брой	80	1	81
	% <i>групата</i>	98,80%	1,20%	100%
	% недостатъчност/достатъчност	100%	100%	

Когато разгледахме степента на недостатъчност вътре в групата компенсирана/декомпенсирана ЧЦ установихме основно дефицит и изразена недостатъчност, с равно разпределение. Аналогични данни намерихме и за лицата с неалкохолна цироза. При ЧЦ с алкохолна етиология 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 ($p=0.020$), (табл. 29). 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. Наблюдавахме основно дефицит и изразена недостатъчност, последвани от лека недостатъчност.

Таблица 29. Промени в плазмените нива на витамин Д при болните с ХЧЗ и контроли под и над 45г възраст.

Група	Възрастова група	брой	x	Sx	Станд. грешка	Min	Max
ХЧЗ	под 45г	133	37,3	23,264	2,017	4,1	113,9
	над 45г	145	31,1	20,620	1,712	3,3	105,4
	общо	278	34,0	22,101	1,326	3,3	113,9
контроли	под 45г	24	66,9	16,520	3,372	44,2	105,6
	над 45г	12	58,2	21,435	6,188	20,6	88
	общо	36	64,0	18,467	3,078	20,6	105,6

Дяловото разпределение 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. Дяловото разпределение на промените в отделните категории и средните стойности не показаха значими промени и в групите според ИТМ, наличието или липса на артериална хипертония при хроничните чернодробни заболявания и при 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 разпределение. Преобладаваше дефицитът и изразената недостатъчност.

Промени в плазмените нива на витамин Д оценени като недостатъчност/достатъчност, не показаха значима разлика при болните с и без хистологична активност или наличие на фиброза при НАСБ, ХХС и ХХВ.

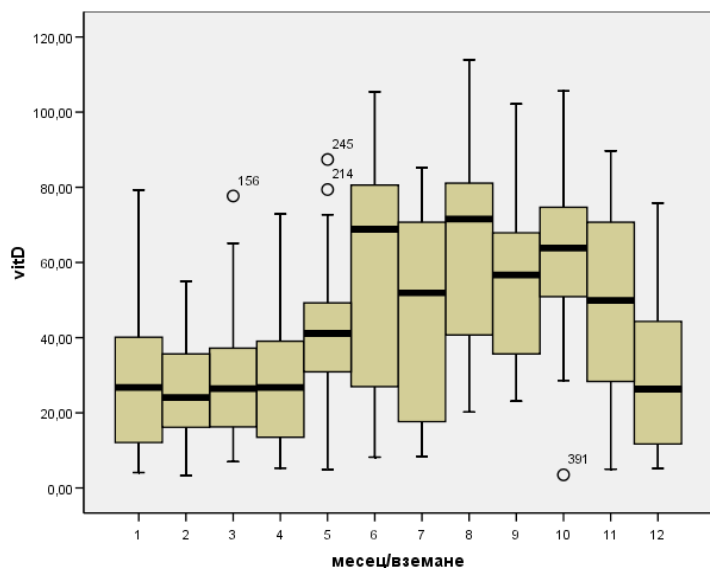
Плазмените нива на витамин Д при ХЧЗ показаха редица корелационни зависимости (табл. 30). При здравите лица установихме обратна зависимост с възрастта (корелационен коефициент -0.336, p= 0.045) и стойностите на LDL- холестерола (-0.362, p- 0.049).

Таблица 30. Корелационни зависимости на плазмените нива на витамин Д при болните с ХЧЗ.

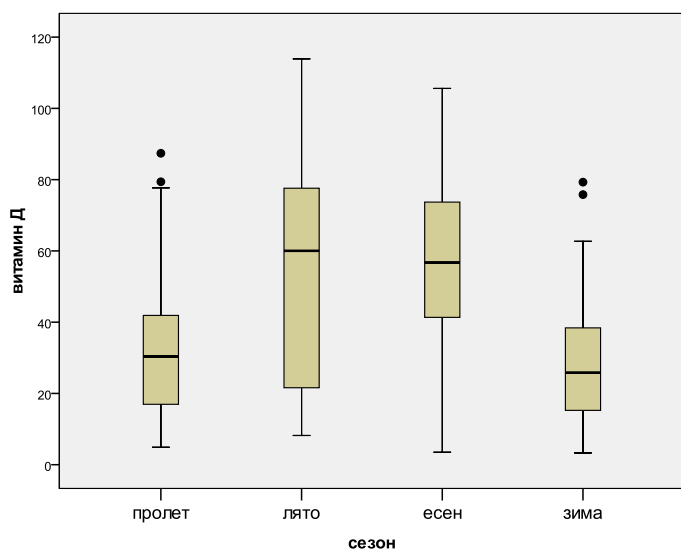
параметър	Корелационен коефициент	p
ХЧЗ		
ГГТ	-0.166	0.006
АФ	-0.245	0.0001
ПВ	-0.333	0.0001
албумин	0.361	0.0001
общ билирубин	-0.178	0.004
директен билирубин	-0.187	0.004
CRP	-0.190	0.032
LDL-х	0.197	0.022
възраст	-0.153	0.011
Child скор	-0.253	0.026

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 разпределение дефицитът при болните с повишени езними достигна до 70% спрямо 30 % - при тези с нормални.

Плазмените нива на витамин Д бяха изследвани през всички сезони и показва сезонни колебания (фиг. 37 и 38). 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 37. Месечни промени при изследваните лица



Фигура 38. 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 есента – 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. 31).

Таблица 31. Сезонни колебания на витамин Д при болните с ХЧЗ.

Група	сезон	брой	х	Sx	Станд. грешка	Min	Max
НАСБ	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	13	58,0	23,883	6,624	22,4	102,2
АЧБ	зима	6	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	1	23,8	.	.	23,8	23,8
ЧЦ	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	12	25,7	22,038	6,362	8,2	78,1
	есен	5	20,0	15,275	6,831	3,5	37,6
ХХС	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	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	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 с и без стеатоза и контролна група здрави лица без стеатоза

Добре известни са метаболитните отклонения – МС, ЗД и инсулиновата резистентност при неалкохолната стеатоза – 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 В 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 НОМА-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 правят 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%
НОМА-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% ,000	22%	Изключващ критерий
НОМА-IR>2	82% ,000	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 пациенти 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

kg/m² за ХХС, 25.32±3.83 и -23,45±3.46 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 НОМА-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 НОМА-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 НОМА-IR установихме при АСХ спрямо всички останали групи със стеатоза ($p < 0.0001 - 0.001$).

Таблица 27. Средните стойности ($\bar{x} \pm SD$) на липидите (mmol/l), глюкозата (mmol/l), инсулина на гладно ($\mu IU/ml$) 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
Триглицерид и	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
НОМА-IR	4.32 ± 2.29	1.43 ± 1.87	4.88 ± 3.25	1.92 ± 1.34

Таблица 28. Средните стойности ($x \pm SD$) на липидите (mmol/l), глюкозата (mmol/l), инсулина на гладно ($\mu IU/ml$) при НАСБ, АСБ и здрави лица без стеатоза.

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

VII. ОБСЪЖДАНЕ

Алкохолът е един от основните етиологични фактори за чернодробно заболяване и допълнително влошава вече съществуващо чернодробно заболяване (8, 9, 75). Оценката на алкохолната консумация представлява трудност, както при остра, така и при хронична алкохолна злоупотреба, защото се основава на базата на анамнестичните данни (77). До момента няма установен сигурен биохимичен маркер, показващ времето, количеството и продължителността на алкохолния прием. В клиничната практика най-често се използват комбинация от стандартни лабораторни показатели – индиректни маркери за алкохол. Сравнително нов показател е релативния CDT (147). Неговото приложение при чернодробни заболявания остава противоречиво и неподкрепено с достатъчно доказателства (65, 71).

Ние оценихме промените и стойността на CDT% при различни по етиология и тежест ХЧЗ и контролна група за да открием значението му за откриване или отхвърляне на алкохолна злоупотреба или абстиненция (4, 77). Отделно оценихме и стандартните индиректни маркери за алкохол и съпоставихме промените с анамнестичните данни за алкохолна консумация (81, 84, 140). Прави впечатление, че дялът на лицата съобщили за дневен прием на абсолютен алкохол над 30 g е изключително нисък – 8% (25 болни). Макар, че средните стойности на всички серумни маркери за алкохол са повишени при болните с алкохолна етиология, то тяхната чувствителност е ниска. CDT% доказва алкохолна злоупотреба само в 8 случая (стойности над 2.5%), а ГГТ, MCV и АСАТ са повишени и в групите с НАСБ, вирусни хепатити В и С и неалкохолна цироза. Така нашите данни като цяло потвърждават ниската специфичност и чувствителност на стандартните индиректни показатели за алкохол, както и ниската чувствителност (81, 84, 140).

Резултатите от различни проучвания показват недостатъчна чувствителност на CDT% (80). Обсъжда се, че една от причините за това се крие в използвания метод на изследване. Хроматографските методи са по-чувствителни спрямо имунологичните (52, 139). В това проучване за първи път се приложи HPLC за характеризиране на % CDT при български пациенти с хронични чернодробни заболявания и здрави доброволци.

И други автори докладват негативни резултати, въпреки сигурната диагноза за алкохолна чернодробна болест и/или анамнеза за хронична алкохолна злоупотреба. Това не може да се обясни напълно, тъй като и самия механизъм на повлияване на трансфериновия синтез от алкохола и/или неговите метаболите не е напълно изяснен (148). Обсъждат се различни фактори, обясняващи разминаването с очакваните резултати като времето на полуживот, генетични особености, наличието на придружаващи заболявания, степента на декомпенсация на чернодробната цироза (9, 75, 139). Сред тях с най-голямо значение е не толкова количеството алкохол, колкото продължителността на консумацията. Тя трябва да е поне за период от две седмици, за да настъпят промени в структурата на трансферина (52).

Най-често фалшиво положителни резултати се свързват с генетични варианти. При 7 от 8 от нашите пациенти със CDT% над 2.5% има анамнеза за алкохолна злоупотреба. Един от пациентите напълно отрича такава. При него няма установен генетичен вариант. В този случай може да се мисли за непълна (скрита) информация, подадена на изследователя от страна на изследвания пациент. В получените хроматограми не доказахме генетични варианти в молекулата на трансферина, дължащи се на промяна в аминокиселинния състав при нито един от изследваните.

Недостатъчно е проучено и влиянието на приема на различните групи медикаменти върху концентрацията на релативния CDT. Такива връзки в представеното проучване не са изследвани (145).

Получените от нас резултати показват по-високи стойности на CDT% при мъжете, в сравнение с жените, както при здрави, така и при хроничните чернодробни заболявания. Като цяло, това може да се обясни с по-високата алкохолна консумация при изследваните от нас мъже. Не се установиха възрастови различия за изследвания трансферин. Не намерихме и корелация между стойността на трансферина и вида на приемания алкохол.

Изследваният CDT% е основно за сметка на дисиалотрансферина (27, 71, 146). Асило- и моносиалотрансферин бяха измерени само при един пациент с АЧБ, с висока алкохолна консумация – 133 g абсолютен алкохол-дневно. Това още веднъж потвърждава, че включените в изследването лица не са с много тежка хронична алкохолна консумация, тъй като изоформите с един и без сиалови остъци се откриват при много тежка и продължителна злоупотреба. Известно е още, че за разлика от другите, свързани с алкохола заболявания, алкохолно увреждане на черния дроб може да възникна и при по-умерена неежедневна алкохолна консумация (над 5 стандартни питиета еднократно – 50 g абсолютен алкохол) и без алкохолна зависимост.

В една част от пациентите (16%) получихме индиферентни резултати, вкл. и пациенти с АЧБ и сигурни данни за алкохолна консумация. Те попадат в т. нар. сива зона, за която все още няма яснота и пълно обяснение. Като причини за това се обсъждат неясния механизъм на загубата на сиаловите вериги и влиянието на други странични фактори (80). Трябва да се има в предвид, че получените норми за % CDT са изработени при изследване на други популации (северно-европейски), различни от българската.

Най-голяма алкохолна консумация по анамнестичните данни отчетохме при пациентите с АЧБ. Доказахме известна връзка на CDT% с количеството консумиран алкохол. Затова и най-високите стойности на

CDT% също отчетохме в групата с алкохолната чернодробна болест, при пациенти с прием на абсолютен алкохол над 30 g /ден. Това индиректно говори за връзката му с хронична злоупотреба.

Получените от нас резултати показват разлика в изследвания трансферин между групата на АЧБ и НАСБ. Това би могло да подпомогне диференциалната диганоза между двете групи заболявания поради сходната клинична картина, биохимични промени и хистологични белези. Ниските нормални стойности на CDT% подкрепят диагнозата НАСБ. Донякъде нормалните стойности на MCV могат да отхвърлят значима алкохолна злоупотреба при НАСБ или вирусен хепатит без оформена ЧЦ. Неясен остава въпросът с абстиненцията, особено при чернодробна цироза. В групата на чернодробните цирози не установихме разлики между алкохолна и вирусна етиология за нито един от изследваните показатели, вкл. и CDT%. Едно от обясненията за това е, че пациентите с алкохолна етиология най-вероятно са намалили/прекратили консумацията във връзка със здравословното си състояние. С напредване на болестта, настъпващите значителни промени в организма заличават етиологичните разлики.

По отношение на CDT% като показател за проследяване на пациентите по време на въздържание, ние установихме по-ниски стойности при въздържание над един месец, не само в сравнение със значителна алкохолна консумация, но дори и при прием на абсолютен алкохол под 30 g /ден. Това се обяснява с времето на полуживот на трансферина - времето за възстановяване на сиаловите остатъци.

Има данни за повлияване на стойностите на CDT% при състояния, протичащи с хипопротеинемия и хипоалбуминемия, анемия и сепсис или декомпенсация на чернодробното заболяване. В тази насока ние доказахме слаба корелация с общия белтък, албумина, INR/ПВ. Връзката на релативния CDT с С-реактивния протеин, доказва функцията му на острофазов белтък (75).

Въпреки възлаганите му надежи CDT% не е идеалният маркер за оценка на хроничната алкохолна злоупотреба. Дори в комбинация с утвърдените стандартни индиректни показатели за алкохол и подробната анамнеза, не се увеличава значително точността в диагностиката на алкохолната чернодробна болест и алкохолната злоупотреба при други хронични чернодробни заболявания.

* * * * *

През последните години като маркери за клетъчна смърт се предлагат два нови неинвазивни серумни показатели – СК65 и по-специфичния за апоптоза - СК30. Те се обсъждат като неинвазивни биомаркери за отдиференциране на НАСХ от проста НАС (3, 8, 30, 110, 167). Сравнителни проучвания с ХХС показват повишени стойности и при това заболяване. В нашето проучване (пилотно) върху малък брой болни оценихме промените в серумните СК30 и 65 при болни с НАСБ, ХХС и ХХВ, като сравнихме резултатите при здрави лица по отношение на СК30.

От получените резултати не установихме възрастови и полови различия, както за стойностите на СК30, така и за СК65. Показахме по-високи стойности при болните за ХЧЗ, в частност с ХХС и ХХВ, в сравнение със здравите контролни лица, аналогично с данните в публикуваната литература (11, 92, 127) . За разлика от данните на други автори обаче, не намерихме по-високи стойности за СК30 при НАСБ сравнение с ХХС, което може да се обясни най-вероятно с малкия брой лица, включени в групите. За СК65 стойностите от нашите резултати са по-високи при ХХС в сравнение с НАСБ. Най-силно изразените промени при ХХС индиректно показват значението на клетъчната смърт при това заболяване.

Дялът на болните с повишените над посочената cut off стойност за СК65 и СК30 е малък. Може би поради това не намерихме връзка с активността и степента на фиброза на черния дроб. Тук трябва да се отбележи, че използваните за сравнение данни са от изследвана популация, различна от българската. Това се потвърждава от различната средна стойност на СК30 и различна стойност на 95-ти перцентил в сравнение с зададените от методиката. Евентуално следващо по-голямо изследване с по-голям брой лица, би предложило нови референтни граници за нашата популация.

От друга страна доказахме силно изразена зависимост между серумните нива на тези форми на цитокератин със серумните активност на аминотрансферазите, особено АСТ, както и ГГТ. От практическа гледна точка тази добрата корелация би ни позволила по-голяма сигурност при оценка на клетъчната смърт чрез определяне само на аминотрансферази и ГГТ (16, 19, 28, 137).

Необходими са по-нататъчни проучвания за оценка на промените на СК30 при НАСХ, както и за значението му при хроничните вирусни хепатити и съпътстваща метаболитна стеатоза.

Нашите резултати показват, че фракциите на СК18- М30 и М65 отразяват активността и стадия на фиброза при хроничен вирусен хепатит в по-голяма степен отколкото при НАСХ, въпреки високата корелация с аминотрансферазите и по-високите стойности при активен хепатит и напреднала фиброза (20, 97, 110). Те все още не могат да се предложат в рутинна клинична практика за отдиференциране на НАС от НАСХ. Една от причините за това е високата прагова стойност и на двете фракции. Необходими са по-нататъчно проучвания върху по-голям брой болни и изработване на нови прагови стойности.

* * * * *

Нараства броят на проучвания, показващи взаимовръзката на дефицита на витамин Д и редица заболявания- как заболяванията задълбочават наличния дефицит и ролята на дефицита в патогенезата и прогресията на заболяванията (4, 6, 95). Това се обяснява с участието на витамин Д не само в калциевата хомеостаза, но и в редица други процеси - клетъчната диференциация и пролиферация, регулация на клетъчната смърт, както и със сложния път на синтез на витамина и неговото активиране в два различни органа (114, 129).

Значението на витамин Д се определя и данните от последните популационни проучвания с разкриване на непрекъснато нарастващия дефицит в различните възрастови групи и намаляване на половите различия. Нарастващият процент на дефицит се обяснява с начина на живот - промените във вида и начина на хранене, по-малкото слънцеизлагане и прекарване на открито, а когато това се осъществява – с намален кожен синтез на витамин поради използването на слънцезащитни фактори (69, 87).

Много са проучваните докладващи дефицит на витамин Д предимно при хронични вирусни хепатити и чернодробна цироза. Няма достатъчно сравнителни данни при различни етиологични групи на ХЧЗ. В тази насока е нашето изследване - да сравним нивата на витамин Д при различни по етиология и тежест ХЧЗ.

Нарастващия дефицит на витамин Д се потвърждава и от нашите данни. Преобладава недостатъчността на витамин Д, особено при ХЧЗ (96.5%). Не малък е и дялът му сред здравите лица - 77.8%. Сред болните с ХЧЗ дялът на отклоненията е относително еднакъв при различните етиологични групи- недостатъчността е силно изразена (около 90%), а при ЧЦ достига 100%. Всички болни с цироза имат различна степен на недостатъчност, като честотата на истинския дефицит е най-висок.

Не се установиха полови различия, както в стойностите на витамин Д, така и в разпределението на степента на дефицита при билните с ХЧЗ и при контролните лица. С напредване на възрастта установихме засилване на дефицита. При групите изследвани лица над 45г не се установи разлика между мъжете и жените, което още веднъж доказва засилващото се значение и разпространение на дефицита сред населението - изчезване на разликата между половете във връзка с постменопаузалните промени при жените (69).

При НАСБ не успяхме да докажем по-ниски нива спрямо другите групи заболявания. Това, както и фактът, че при изследваните от нас лица не доказахме връзка с ИТМ, показва сложната роля на витамина в метаболитните процеси, а не само просто “захващане” в подкожната мастна тъкан (163). Предстои изясняването на влиянието на адипокините върху кожния синтез, връзката на витамин Д с инсулиновата резистентност и ЗД (57, 98, 156).

Подобно на нееднозначните данни от литературата, въпреки че не установихме връзка със затлъстяването и наличието на артериална хипертония, доказахме по-ниски стойности при пациентите със ЗД 2 тип (31).

Влиянието на алкохола върху метаболизма на витамин Д наблюдавахме в групата на ЧЦ, където по-изразен дефицит се установи при алкохолните цирози в сравнение с неалкохолните. Според някои автори това може да се отдаде на малнутрицията, която често съпътства алкохолната злоупотреба и зависимост, на токсичното действие на алкохолна или на неговите метаболити, които те оказват не само върху черния дроб, но и върху другите органи в човешкия организъм (31, 78, 119).

Тази разлика обаче, се установява само в първия стадий на цирозата. С напредване на заболяването и декомпенсация тази разлика се заличава. Водеща става тежестта на заболяването, а не етиологията- факт, който се

потвърждава и от липсата на разлика между вирусните В и С цирози и в компенсаторния стадий. С нарастване на тежестта по Child класификацията се засилва и дефицита на витамин Д (63, 73). Тук трябва да посочим ролята на черния дроб при хидроксилирането на витамин Д, синтезата DBP (109, 126). За значението на черния дроб в метаболизма на витамин Д можем да предположим и от факта, че при ЧЦ дефицитът губи своята сезонност. Най-ниските стойности на витамин Д установихме при ЧЦ в сравнение с останалите чернодробни заболявания без оформен ЧЦ и контролните лица. Най-изразени са промените при ЧЦ - както количествени, така и качествени.

Връзката на витамин Д с тежестта на чернодробното заболяване видяхме и от установените корелации между витамин Д и албумина, ПВ, общия и директен билирубин.

Въпреки малкия брой изследвани лица, установихме отрицателна корелация между С-реактивния протеин и витамин Д, което говори в подкрепа на противовъзпалителната роля на витамин Д. Тук трябва да споменем и по-силно изразената активност на АСТ при по-тежък витаминен дефицит.

Нашите резултати не показват разлика в нивата на витамин Д при болните с и без стеатозна болест –неалкохолна и алкохолна, и при хроничните вирусни хепатити. Също не показахме връзка на витамин Д, както с хистологичната активност на вирусните хепатити, както и с вирусния товар. Единствено в групата с хронични вирусни хепатити показахме изразено намаление на витамин Д в напредналите стадии на фиброза, т.е. начална чернодробна цироза.

Литературните данни за вирусните хепатити също не са категорични (47, 101, 135). Трябва да отбележим, че изследваните от нас групи с ХХВ и ХХС са малки, с различия по отношение на хистологичната активност и фиброза. Част от лицата провеждат противовирусна терапия. Ефектът на

витамин Д - противовъзпалителен, антифибротичен и противовирусен, бихме могли да изследваме при следващи проучвания, вкл. с проследяване в динамика. Все пак да посочим, че задачата на нашето изследване е да сравним витамин Д между различните етиологични групи чернодробни заболявания, а не неговия ефект при хронични вирусни хепатити.

При всички, изследвани от нас ХЧЗ без оформена ЧЦ, установихме сезонни колебания. Стойностите на плазмените нива намаляват през зимата и в по-малка степен през есента в сравнение с лятото и есента. За разлика от това при болните с ЧЦ сезонните колебания са незначими, поради водещата роля на тежестта на чернодробното заболяване за дефицита на витамина Д.

* * * * *

По-висока е честотата и степента на отклонение на белезите на метаболитния синдром, захарния диабет и сурогатния маркер за инсулинова резистентност НОМА-IR, не само при болните с първична, но и при тези с придружаваща стеатоза в сравнение с лицата без стеатоза (28, 79, 142). Абдоминалното и общо затлъстяване при алкохолната стеатозна болест доближава метаболитните промени до тези на неалкохолна стеатозна болест. Двете заболявания са свързани с по-тежки отклонения в сравнение с придръжаващата стеатоза при хроничен хепатит В и С (56, 74, 142). Общия холестерол и LDL-холестерола са най-ниски при хроничен хепатит С със стеатоза, а НОМА-IR - при алкохолна стеатозна болест. Известно е, че стеатозата, инсулиновата резистентност, затлъстяването и ЗД при ХХС са свързани с прогресията на чернодробното заболяване и отговора на противовирусното лечение с интереферон и рибавирин. Значението на тези метаболитни фактори е много слабо проучено при болните с хронична HBV инфекция.

При НАСБ се очертават по-изразени отклонения в параметрите за инсулинова резистентност, а при АСБ – по-изразени промени в холестерола, повишение на пикочната киселина, промени в кръвната захар с по-висока честота на ЗД. Въпреки че тежка стеатоза е по-характерна за НАСБ и болните с гранична консумация на алкохол, то по-напреднала фиброза се открива около 2 пъти повече при системна консумация на алкохол у болни с метаболитни прояви и затлъстяване (39, 76). Търсена е връзка между ЗД тип 2 и количеството, и качеството на приетия алкохол. Приема се, че умереният прием на алкохол не е свързан с по-голям риск за ЗД, ако няма други предразполагащи фактори за това. Обратно голямото количество алкохол се отразява неблагоприятно върху глюкозната обмяна. Намаляването му от една напитка дневно до една/седмично води до редуциране на релативния риск за ЗД. Новопоявилният се диабет при системна консумация на големите количества алкохол е тежък, най-често с хипоинсулинемия, но е обратим след спиране на алкохолната консумация с възстановяване на инсулиновата секреция. При останалите случаи диабетът е свързан по-често с хиперинсулинемия. Приема се, че алкохолната хипогликемия се дължи на блокиране на превръщането на пирувата в глюкоза вследствие на намаляване на концентрацията му при алкохолния метаболизъм. Хиперурикемията също се свързва със системен голям прием на алкохол. Данните от проведените до сега сравнителни проучвания за откриване на приликите и разликите между НАСБ и АСБ са недостатъчни и много противоречиви. Независимо от това, някои от наблюдаваните от нас промени са установявани и от други автори, например за холестерола. Не трябва да се забравя, че за прогресията на заболяване играят роля и много други фактори.

В заключение, затлъстяването и метаболитният синдром се отразяват на всички форми на чернодробно заболяване, както и на това с алкохолна етиология.

VIII. 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 консумация) 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(ОН) витамин Д, определени чрез ID-LC-MS/MS, са по-ниски при хроничните чернодробни 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 заболяване. 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 НОМА-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 НОМА-IR - при алкохолна стеатозна болест.

IX. ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова А.М., Р. Ковачева, А.Шинков и сътр. Разпространение и характеристика на метаболитния синдром. Ендокринология, 2007, 2, 68-77
2. Българска Хепатогастроентерология, Алкохолна чернодробна болест, Бр.2, 2010г.
3. Българска Хепатогастроентерология, Неалкохолна стеатозна болест на черния дроб, Бр.2, 2010г.
4. Герова, Д., Б. Галунска, М. Желязкова-Савова, Д. Паскалев. Витамин D: отвъд рубикона на рахита. Изд. "Стено", Варна, с. – 71, 2012.
5. Захариева С, М.Янева. Невроендокринни основи на метаболитния синдром, 2, 2003.
6. Йонова Д., Бонева Р., Фибробластен растежен фактор-23-фосфат-регулираща субстанция. Медицински преглед, 2008, 44(4):19-20.
7. Каменова П. Клинична приложимост на дефиницията на метаболитен синдром на Международната Диабетна Федерация при пациенти с тип 2 ЗД, 2006
8. Кръстев З. и колектив. Вътрешна медицина, 2-ро издание, 2010.
9. Матева Л.; Инсулинова резистентност и захарен диабет при хронични чернодробни заболявания, 2009г
10. Матева, Л. и сътр. Глюкозотолеранс и инсулин в серума на болни с чернодробна цироза и хроничен персистиращ хепатит. Съвр. мед., 35,. 1984, 8, 325-330.
11. Матева, Л. и сътр. Инсулинова резистентност при болни с хронични чернодробни заболявания. Съвр. мед., 36, 1985, 5, 21-26.

12. Матева, Л. Промени във въглехидратната обмяна при хронични чернодробни заболявания. Кандидл Дисерт., С, 1988
13. Матева, Л., Р. Матинчева. Инсулинова резистентност и контраинсуларни хормони при болни с хроничен хепатит и чернодробна цироза. Съвр. мед., 37, 1986, 7, 20-23.
14. Матева, Л., Р. Матинчева. Съчетание на хроничните чернодробни заболявания с диабет и тяхната компенсация. Съвр. мед., 34, 1983, 10, 579-585.
15. Митев, В., Л. Сираков. Инсулинов рецептор - I част. Съвр. мед., 36, 1985, 12, 3-7.
16. Митев, В., Л. Сираков. Инсулинов рецептор - II част. Съвр. мед., 37, 1986, 1, 3-8.
17. Петкова М. Метаболитен синдром и захарен диабет. 12-ти Национален симпозиум по ендокринология, 12-14 юни 2008 Пловдив, Ендокринология, 2008, 1 (абстракт).
18. Попова Д. Висцералното затлъстяване - сърдечносъдов рисков фактор. Доктор Д, 1999
19. Христов, В. Глюкозно клампиране - съвременен метод за изследване инсулиновата секреция и резистентност. Вътр. бол., 25, 1986, 3, 32-39.
21. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. Gastroenterology, 129, 2005, 113-21.
22. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. J Hepatol., 42, 2005, 132-8.

23. Akriviadis, E. A. Treatment of acute alcoholic hepatitis. In "Update in treatment of liver disease. Edited by V. Arroyo et al., Ars Medica, Spain, 2005, p. 427-432.
24. Amiel, S. A. et al. Hypoglycemia and glucose counterregulation in normal and insulin-dependent diabetic subjects. -Diabetes, Metabolism Reviews, **4**, **1988**, **1**, **71-89**.
25. Anastassios G, Lau Joseph, et al. The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis, Published online, July 02, 2013.
26. Anttila P, Jarvi K, Latvala J, et al. Alcohol Alcohol, 2003; 38:415
27. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation. Clinical Chemistry, 2001; 47:1
28. Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, et al. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? Gut, 55, 2006, 123-130.
29. Bacon et al. Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels. Hepatology, 2002; 36:S179-S184.
30. Bantel et al. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. Hepatology, 2004; 40(5); 1044-46.
31. Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, et al. Strong association between nonalcoholic fatty liver enzymes (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. BMC Medicine, 2011, 9:85.
32. Bedossa et al. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. Hepatology, 2003; 38:1449-57.
33. Bergstrom JP, Helander A. Clinical characteristics of carbohydrate-deficient transferrin (% disialotransferrin) measured by HPLC: sensitivity,

- specificity, gender effects and relationships with other alcohol biomarkers. *Alcohol and Alcoholism*, 2008; 43 (4):43-41.
34. Bortolotti F, Paoli GD, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2000-2005. *Journal of Chromatography B*, 2006; 841:96-109
35. Bouillon R, Auwerx J, Dekeyser L, et al. Serum Vitamin D Metabolites and Their Binding Protein in Patients with Liver Cirrhosis. Published online 01 July, 2013.
36. Bradbury MW. Lipid Metabolism and Liver Inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 290, 2006, G194–G198
37. Bravo et al. Liver biopsy. *N Eng J med*, 2001; 344:495-500.
38. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.*, 33, 2005, 2, 68-71.
39. Brunt E. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.*, 2002, 6, 399– 420
40. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*, 48, 2005, 634–642.
41. Bugianesi E, Leone N, Vanni E et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 123, 2002, 1, 134–140.
42. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 42, 2005, 5, 987-1000.
43. Buzzelli G et al. Glucose intolerance in chronic active hepatitis. In: *The endocrines and the liver*. Serono Symposia vol.51, Edited by M. Langer,

- L. Chiandussi, IJ Chopra, L. Martini, London, Academic Press. Inc., 1982, 357-370.
44. Campbell MS, Reddy KR. Review article: the evolving role of liver biopsy. *Aliment Pharmacol Ther.*, 20, 2004, 3, 249-59.
 45. Caulin C, Calvesen G, Oshima R. Caspase Cleavage of Keratin 18 and Reorganization of Intermediate Filaments during Epithelial Cell Apoptosis, 1997.
 46. Chen J, Conigrave KM, Macaskill R, et al. Combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase to increase diagnostic accuracy for problem drinkers. *Alcohol Alcohol*, 2003; 38:574
 47. Cholongitas E, Theodoridou E, et al. Review article: the extra-skeletal effects of vitamin D in chronic hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 634–646
 48. Chui K, Chu A, Go V, et al. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am. J Clin Nutr*, 2004, 79:820-825.
 49. Clark et al. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA*, 2003; 289 (22):300-4.
 50. Clemens T, Henderson S, et al. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D₃. *Lancet*, 1982, 1:74-76.
 51. Collantes R, Ong JP, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease and the epidemic of obesity. *Cleve Clin J Med.*, 71, 2004, 8, 657-64.
 52. Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, et al. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 45, 2007, 80-87.
 53. Day CP. Mechanisms of progression in nonalcoholic fatty liver disease. In “Update in treatment of liver disease. Edited by V. Arroyo et al., *Ars Medica*, Spain, 2005, 289-294
 54. De Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta*, 1990; 190:1-46

55. Demir C, Demir Mehmet. Vitamin D levels in patients with chronic hepatitis B virus infection and naturally immunized individuals.
56. Demir K, Akyuz F, Ozdil S et al. What is the reason of elevated alanine aminotransferase level in HBeAg negative patients with low viremia: NAFLD or chronic hepatitis? *Ann Hepatol.*, 6, 2007, 2, 92-6
57. Drincic, A.T.; Armas, L.A.G.; van Diest, E.E.; Heaney, R.P. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity* 2012, 20, 1444–1448.
58. Eisman J, Shepard R, Deluca H. Determination of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in human plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1977, 90:298-305.
59. Fairbanks, K. Alcoholic liver disease. The Cleveland Clinic Disease Management project. Cleveland Clinic Foundation, 2004
60. Farnik H, Boiunga J, Berger A. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. *Hepatology* , 28, 2013, 4:1270-1276.
61. Feldstein et al. Cytokeratin-18 fragments levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology*, 2009; 50(4):100-3.
62. Figlie NB, Benedito-Silva A, Monteiro M, et al. Biological markers of alcohol consumption in nondrinkers, drinkers, and alcohol-dependent Brazilian patients. *Alcohol Clin Exp. Res*, 2002; 26:1062
63. Fisher L, Fisher A. Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 513–20.
64. Fleming M, Brown R, Brown J, et al. *J Stud Alcohol*, 2004; 4:631
65. Fleming MF, Anton RF, Spies C. A review of genetic, biological, pharmacological and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004; 28 (9):1347-55.

66. Fletcher LM, Kwok-Gain I, Powell LW, Halliday JW. Marker of chronic alcohol ingestion in patients with nonalcoholic steatohepatitis: an aid to diagnosis. *J Toxicol Environ Health B*, 2005; 10 (4):315-77
67. Fraquel et al. Etiology-related determinations of liver stiffness values in chronic viral hepatitis B and C. *J Hepatol*, 2011; 54 (4):621-8.
68. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, et al. Suppression of rennin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int*, 2008, 74:1394-1402.
69. Ginde A, Liu M, Camargo C. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1998-2004. *Arch Intern Med*, 2009, 169:626-632.
70. Golka K, Weise A. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)- a Biomarker for long-term alcohol Consumption. *Journal of Toxicological Environmental Health B Crit Rev.*, 2004; 7(4):319-37.
71. Golka K, Wiese A. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)- a Biomarker for long-term alcohol Consumption. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2004; 7 (4):319-77
72. Gomez A, Conde A, Aguiar JA, et al. Diagnostic usefulness of carbohydrate-deficient transferrin for detecting alcohol-related problems in hospitalized patients. *Alcohol and Alcoholism*, 2001; 36(3):266-70
73. Gonzalez-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fernandez-Perez R, Casado-Caballero F, Ruiz-Escolano E, Olivares EG. Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4325-30.
74. Gordon A, McLean CA, Pedersen JS et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B and C: predictors, distribution and effect on fibrosis. *J Hepatol.*, 43, 2005, 38-44.

75. Gramenzi A, Caputo F, Biselli M et al. Review article: alcoholic liver disease –pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther.*, 24, 2006, 8, 1151-61.
76. Gramenzi A, Caputo M, Biselli F, Kuria F, Loggi P, Andreone P, Bernardi M. Alcoholic Liver Disease-Pathophysiological Aspects and Risk Factors. *Alimentary liver disease- pathophysiological aspects and risk factors*, 2006
77. Haber S, Warner R, Devanshi S, Mark D, Gorrell, Geoffrey W Mccaughan. Pathogenesis and Management of Alcoholic Hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003.
78. Hadda J, Chyu K. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab*, 1971, 33:992-995.
79. Harrison SA. Correlation between insulin resistance and hepatitis C viral load. *Hepatology*, 43, 2006, 1168-1169.
80. Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO. Interference of transferring isoform types with carbohydrate-deficient transferring in the identification of alcohol abuse. *Clin. Chem*, 2001 47 (7), 1225-1233
81. Helander A, Neural J. Biological markers in alcoholism. Review article. *Trans. Suppl*, 2003; 66:15
82. Helander, M. Fors, B. Zakrisson *Alcohol & Alcoholism* (2001) 36 (5), 406-412. ; A. Helander, G. Eriksson, H. Stibler, J.-O. Jeppsson,.; T. Arndt, *Clin. Chem.* (2001) 47(1), 13–27.
83. Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently normal or abnormal aminotransferase levels. *J Hepatology*, 2000; 33(4):640-7.
84. Hietala J, Koivisto H, Anttila P, et al. Comparison of the combined marker GGT-CDT and the conventional laboratory markers of alcohol

abuse in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers. *Alcohol and Alcoholism*, 2006; 41 (5):528-533

85. Hock B, Schwarz M, Domke I, Grunter VP, Wuertemberger M, Schiemann U, Horster S, Limmer C, Stecker G, Sojka M. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gammaglutamyltransferase and mean corpuscular volume as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Alcohol and Alcoholism*, 2005; 20:15-25
86. Holick M. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med*, 2007, 357:362-371.
87. Holick M, McCollum Award Lecture. Vitamin D-new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr*, 1994, 60:619-630.
88. Hollis B, Kamerud J, Selvaag S, et al. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an 125I-labeled tracer. *Clin Chem*, 1993, 39:529-533.
89. Hollis B, Pilz S, Vieth R. Vitamin D dietary intakes: implications and significance in clinical practice. ISW-IFCC-WorldLab-Euromedlab Berlin 15-19 May 2011, *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49 Special Suppl, S185.
90. Hui JM, Kench JG, Chitturi S et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology*, 38, 2003, 2, 420-427
91. Huo TI, Wu JC, Lee PC, Tsay SH, Chang FY, Lee SD. Diabetes mellitus as a risk factor of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Gastroenterol*. 2000 Apr;30(3):250-4.
92. Jfjdfadk
93. Ji Y, Studzinsky G. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein are required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *G. Biochemistry and metabolism of vitamin*

- D. S- IFSS-Woldlab-Euromedlab Berlin 19-19 May, 2011, Clin Chem lab Med, 2011, 49 Special suppl, S130.
94. Joka et al. prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosius and nonalcoholic steatohepatitis. J Hepatol, 2012.
95. Jones G. Biochemistry and metabolism of vitamin D.S- IFCC-World Lab- Euromeilab Berlin 19-19 May 2011, 49 Special Suppl, S130.
96. Jung R T, Davie M, Hunter J O, et al. Abnormal vitamin D metabolism in cirrhosis. Gut, 1978;19:290-293.
97. Kerr Martha. New Biomarker May provide Noninvasive Method for Assessing Nonalcoholic Fatty Liver Disease, 2007.
98. Kong J, Li Y. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3t3-11 cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006, 290, E916–E924.
99. Kronenberger et al. Apopotic cytokeratin 18 neoepitopes in serum of patients with chronic hepatitis C. Journal of Viral Hepatites, 2005; 12:307-314.
100. Laatikainen T, Alho A, Vartianen E, et al. Alcohol Alcohol, 2002; 37:282
101. Ladero JM, Torrejon MJ, Sanchez-Pobre R, et al. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. J Hepatol, 2013, 12 (2):199-204.
102. Leers et al. Immunohistochemical detection and mappin of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J Pathhtology, 1999; 187:567-572.
103. Leers M. et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neoepitope exposed during early apoptosis. J Hepatology 1999, 187 (Abstract).

104. Levin A, Bakris G, Motlich M, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium and phosphorus in patients with chronic kidney disease: resultados of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int*, 2007, 71:31-38.
105. Levitsky J, Mark E, Mailliard M. Diagnosis and Therapy of Alcoholic Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2004;24(3)
106. Lo C, Paris P, Clemens T, et al. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr*, 1985, 42:644-649.
107. Loria P, Lonardo A, Bellentani S, Day CP, Marchesini G, Carulli N. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease: an open question. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 17, 2007, 9, 684-98.
108. Machado M, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. *Nutrition and the gastrointestinal tract. Curr Opin Clin Nutrition & Metabolic Care*, 9, 2006, 5, 637-642.
109. Malham M, Jorgensen S, Ott P, et al. Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology. *J Hepatol* 2009; 45: 115–25.
110. Malik et al. The clinical utility of biomarkers and the nonalcoholic steatohepatitis CRN liver biopsy scoring system in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009;24:564-8.
111. Malik R, Chang M, Bhaskar K, Nasser I, Curry M, Schuppan D. The Clinical Utility of Biomarkers and the Nonalcoholic Steatohepatitis CRN Liver Biopsy Scoring System in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2009; 24(4):564-568.
112. Marcellin et al. Therapy of hepatitis C: patients with normal aminotransferase levels. *Hepatology*, 1997; 26:133-136.

113. Mathiasen I, Serggev I, Bastholm L, et al. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2002, 277:30738-45.
114. Mathieu C, Badenhop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of art. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16:261-266.
115. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116, 1999, 6, 1413–1419.
116. McAvoy NC, Ferguson JF, Campbell JW, Hayes PC. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Natural History, Pathogenesis and Treatment. *Br J Diabetes Vasc Dis.*, 6, 2006, 6, 251-260.
117. McCullough AJ, O'Connor JF. Alcoholic liver disease: proposed recommendations for the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol.*, 93, 1998, 11, 2022-36.
118. Miller PM, Anton RF, Egan BM, et al. Excessive alcohol consumption and hypertension: clinical implications of current research. *J Clin Hypertens*, 2005; 7:346
119. Mobarhan S, Russell R, Recker R, et al. Metabolic Bone Disease in Alcoholic Cirrhosis: A Comparison of the Effect of Vitamin D₂ 25-Hydroxyvitamin D, or Supportive Treatment. Published online 24 July, 2008.
120. Mohammad Alizadeh AH, Fallahian F et al. Insulin resistance in chronic hepatitis B and C. *Indian J Gastroenterol.*, 25, 2006, 6, 286-9
121. Myers et al. Transient elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis: a multicentre Canadian study. *J Gastroenterol*, 2010; 24 (11):661-70.

122. Nakano T, Cheng YF, Lai CY, et al. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J Hepatol* 2011; 55: 415–25.
123. Narita R, Abe S, Kihara Y, Akiyama T, Tabaru A, Otsuki M. Insulin resistance and insulin secretion in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004; 41: 132-138
124. Niemelae O. Biomarkers in alcoholism. *Clinical Chemistry*, 2007;39-49
125. Nikkari ST, Koivu TA, Kalela N, et al. Changes in Atherosclerosis Risk Factors Induced by Hormone Replacement Therapy or Ethanol Consumption. *Atherosclerosis*, 2001; 154:485
126. Nusbaum J, Wright HC, Smirniotopoulos J, et al. Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to severity and not etiology of liver disease. *Hepatology* 2011; 54(Suppl. 4): 1253A.
127. Oh M, Winn J, Poordad F. Review Article: Diagnosis and Treatment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2008; 28(5):503-522.
128. Olefsky JM, Kolterman OG, Scarlett JA. Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. *Am. J Physiol Endocrinol Metab.*, 6, 1982, 1,E 15-30.
129. Palomer H, Gonzalez-Clemente J, Blanco-Vaca F, et al. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10(3):185-97.
130. Papatheodoridis GV, Chrysanthos N, Savvas S et al. Diabetes mellitus in chronic hepatitis B and C: prevalence and potential association with the extent of liver fibrosis. *J Viral Hepat.*, 13, 2006, 5, 303–10.

131. Penesova A, Radikova Z. Comparison of insulin sensitivity indices calculated from standard 3-sampled and frequently sampled oral glucose tolerance test. *Endocr Regul.*, 38, 2004, 4, 167-71.
132. Petrides AS, Strohmeyer G. Insulinresistenz bei Lebererkrankungen. *Z. Gastroenterologie*, 24, 1986, 8, 403-415.
133. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Nuyens V, et al. Rapid alterations in transferrin glycosylation during sepsis. *Shock*, 2005; 24 (1):48-52
134. Picardi A., D'Avola D, Gentilucci UV et al. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. *Diabetes Metab Res Rev*, 22, 2006, 274–283.
135. Rahman A, Branch A. Vitamin D for your patients with chronic hepatitis C. *Ame J Hepatol*, 2012.
136. Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, Steinmeyer A, Zugel U, Roman J. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;18: 142–50.
137. Regev et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patient with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterology*, 2002; 97:2614-8.
138. Ricardo A, DeUgarte CM, Chen Y-DI. What's the best way to diagnose insulin resistance and hyperinsulinemia? *Contemporary OB/GYN*, 50, 2005, 3, 66-74.
139. Ridinger M, Koehl Ph, Gaebele E, et al. Analysis of carbohydrate deficient transferrin serum levels during abstinence. *Experimental and Molecular Pathology*, 2012; 50-53
140. Rinck D, Frieling H, Freitag A, et al. Combinations of carbohydrate-deficient transferrin, mean corpuscular erythrocyte volume, gamma-glutamyltransferase, homocysteine and folate increase the

significance of biological markers in alcohol dependent patients. *Drug and Alcohol Dependence*, 2007; 89:60-65

141. Rizza, K, A, et al. Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man, - *Diabetologia*, 28, 1985,2, 70-75.
142. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, et al. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genome 3. *J Hepatol* 2000;33:106–15.
143. Sergeev I, Rhoten W. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic b-cell line. *Endocrinology*, 1995, 136:2852-2861.
144. Sharma AM, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and adipose tissue-understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 2007, 386–395.
145. Sillanauke P, Olsson U. Improved diagnostic classification of alcohol abusers by combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem*, 2001; 47:681
146. Stibler H, Borg S. Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients and healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest*, 1991; 51:43-51
147. Stibler H, Kjellin KG. Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. *J Neurol Sci*, 1976; 30:269-85
148. Stibler H. carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem*, 1991; 7:2029-37

149. Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Further Expression of the Metabolic Syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.*, 22, 2007, 3, 293-303.
150. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM* 2002; 95: 787–96.
151. Titus L, Jackson E, Nanes M, et al. 1.25-Dihydroxyvitamin D reduces parathyroid hormone receptor number in ROS 17/2.8 cells and reverts the glucocorticoid-induced increase in these receptors; relationship to adenylate cyclase activation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1991, 6(6):631-637.
152. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Manesis EK et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B develops due to host metabolic factors: a comparative approach with genotype 1 chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis.*, 39, 2007, 10, 936-42.
153. Turner RC et al. Quantitative modelling of endocrine diseases as exemplified by diabetes. *Clin Endocrinol*, 26, 1987, 1, 107-116.
154. van Noort WL, de Jong G, van Eijk HG. Purification of isotransferrins by concanavalin A Sepharose chromatography and preparative isoelectric focusing. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1994; 32:885-92
155. Vanlint S. Vitamin D and Obesity. *Nutrients* 2013, 5, 949-956.
156. Verhave G, Siegert C. role of vitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human auto reactive T cells via the selective induction of apoptosis. *J Autoimmun*, 2004, 23:233-239.

157. Wagner N, Wagner K, Schley G, et al. 1.25 dihydroxyvitamin D₃-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-and bax. *Exp Eye res*, 2003, 77:1-9.
158. Waldhaus W et al. Effect of stress hormones on splanchnic substrate and insulin disposal after glucose ingestion in healthy humans. *Diabetes*, 36, 1987, 2, 127-135.
159. Wang CC, Hsu CS, Liu CJ et al. Association of chronic hepatitis B virus infection with insulin resistance and hepatic steatosis. *J Gastroenter Hepatol.*, 23, 2008, 5, 779–782.
160. Wang T, Pencina M, Booths S, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*, 2008, 117:503-11.
161. Wieckowska A, Zein N, Yerian L, Lopez A, McCullough A, Feldstein A .In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2006; 44(1):27-33.
162. Wieckowska et al. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2006; 44:27-33.
163. Wortsman J, Matsuoka L, Chen T, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72:1004-13.
164. Wortsman J, Matsuoka L, Chen T, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*, 2005, 72:1004-13.
165. Yang L, Yang J, Venkateswarlu S, et al. Autocrine TGF-beta signaling mediates vitamin D₃ analog-induced growth inhibition in breast cells. *J Cell Physiol*, 2001, 188:383-93.
166. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Keskin M, Kiyici M. Elevated serum levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 (CK18-Asp396) in patients with nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Medical Scientific Monitoring*, 2009; 15(4):CR189-93.

167. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Kesklin M, Kiyici M. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 2007; 13(6):837-44.
168. Yilmaz Y. Systematic Review: Caspase-cleaved Fragments of Cytokeratin 18- the Promise and Challenges of a Biomarker for Chronic Liver Disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2009; 30(11-12):1103-9.
169. Younossi et al. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg*, 2008; 18:1430-7.
170. Younossi Zm, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obesity Surgery*, 2008; 18(11):1430-7.