



Медицински университет – София  
Катедра по Вътрешни болести  
УМБАЛ “Св. Иван Рилски”  
Клиника по Гастроентерология

**Д-р Евелина Георгиева Атанасова**

**ЧЕРНОДРОБНОТО УВРЕЖДАНЕ ПРИ ЛЕЧЕНИЕ С  
ПЕГИЛИРАН ИНТЕРФЕРОН И РИБАВИРИН НА  
ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧЕН ХЕПАТИТ С**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на образователна и  
научна степен “доктор”  
Научна специалност – Гастроентерология

**Научен ръководител:**  
Доц. Д-р Деян Желев, дмн

**Консултант:**  
Проф. д-р Захарий Кръстев, дмн

София, 2016

Медицински университет – София  
Катедра по Вътрешни болести  
УМБАЛ “Св. Иван Рилски”  
Клиника по Гастроентерология

**Д-р Евелина Георгиева Атанасова**

**ЧЕРНОДРОБНОТО УВРЕЖДАНЕ ПРИ ЛЕЧЕНИЕ С  
ПЕГИЛИРАН ИНТЕРФЕРОН И РИБАВИРИН НА  
ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧЕН ХЕПАТИТ С**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на образователна и  
научна степен “доктор”  
Научна специалност – Гастроентерология

**Научен ръководител:**  
Доц. Д-р Деян Желев, дмн

**Консултант:**  
Проф. д-р Захарий Кръстев, дмн

София, 2016

## СЪДЪРЖАНИЕ:

I. Въведение.....	стр. 7
II. Литературен обзор.....	стр. 10
1. Показатели на възпалението – Биомаркери.....	стр. 10
1.1. Алфа-2 макроглобулин.....	стр. 11
1.2. Хаптоглобин.....	стр. 13
1.3. CRP.....	стр. 16
1.4. Желязна обмяна и значението ѝ за чернодробното възпаление .....	стр. 19
1.4.1. Прохепсидин/ хепсидин - маркер на желязната обмяна, както и на възпалението.....	стр. 20
1.5. Албумин, глобулини и имуноглобулини.....	стр. 24
1.6. Цитокини, участващи в чернодробното възпаление - TNF- $\alpha$ .....	стр. 27
2. Фиброза и оценката ѝ.....	стр. 29
2.1. Фиброгенеза.....	стр. 29
2.2. Фибринолиза.....	стр. 30
2.3. Фактори, повлияващи развитието на фиброзата при хепатит С .....	стр. 30
2.4. Чернодробна биопсия.....	стр. 32
2.5. Хистологична оценка на чернодробното увреждане.....	стр. 33
2.5.1. Степен на чернодробното увреждане.....	стр. 33
2.5.2. Стадий на чернодробната фиброза.....	стр. 34
2.6. Оценка по METAVIR.....	стр. 34
2.7. Еластография.....	стр. 36
2.8. Серумни маркери за оценка на фиброзата.....	стр. 36
2.8.1. Модели на серумни маркери, базирани на алгоритъм.....	стр. 37
* SOS FS.....	стр. 38
* GAMAGEN.....	стр. 40
* APRI.....	стр. 41
* FIB-4.....	стр. 42
* FCI.....	стр. 44
* GUCI.....	стр. 44
2.9. Интересът към алгоритъм-базираните серумни модели.....	стр. 45

3. Лечение на хроничния хепатит С.....	стр. 46
3.1. „Стандарт на лечение“ – пегилиран интерферон и рибавирин.....	стр. 47
3.2. Безинтерферонов режим на терапия на хроничния хепатит С.....	стр. 47
4. Обобщение.....	стр. 48
III. Цели и задачи.....	стр. 49
1. Цели.....	стр. 49
2. Задачи.....	стр. 49
IV. Материали и методи.....	стр. 50
1. Изследвани лица.....	стр. 50
2. Използвани методи.....	стр. 54
V. Резултати.....	стр. 59
A. Изходни нива на показателите на възпалението.....	стр. 59
1. Показатели на възпалението, пол, генотип и възраст.....	стр. 59
1.1. А2МГ.....	стр. 61
1.2. Прохепсидин.....	стр. 62
1.3. Хаптоглобин, TNF-а, hsCRP, албумин, IgG, HCV RNA .....	стр. 62
2. Показатели на възпалението и хематологични показатели.....	стр. 64
3. Показатели на възпалението и хистологична активност и фиброза .....	стр. 64
3.1. А2МГ.....	стр. 66
3.2. Прохепсидин.....	стр. 67
3.3. Хаптоглобин, TNF-а, hsCRP, албумин, IgG, HCV RNA .....	стр. 68
4. Скорове - връзки помежду им и с показателите на възпалението .....	стр. 71
4.1. Модифициране на класическия GAMAGEN индекс.....	стр. 71

4.2.	Скорови системи при пациентите, провели лечение с директно действащи антивирусни медикаменти (група С).....	стр. 73
5.	Корелационни връзки между биохимични, хематологични и морфологични показатели.....	стр. 73
V.	Промяна на показателите на възпалението при ефективно и неефективно лечение.....	стр. 77
1.	Вирусологичен отговор.....	стр. 77
2.	Промени в нивата на хемоглобина и тромбоцитите.....	стр. 78
2.1.	Промени в хемоглобиновите нива.....	стр. 78
2.2.	Промени в тромбоцитните нива.....	стр. 81
3.	Динамика на показателите по време на лечение.....	стр. 83
a.	Серумен албумин.....	стр. 85
b.	Серумен Алфа 2-макроглобулин.....	стр. 86
c.	Хаптоглобин.....	стр. 90
d.	TNF-a, hsCRP, IgG.....	стр. 93
e.	Прохепсидин.....	стр. 95
4.	Промяна на скоровите системи по време на лечение .....	стр. 100
4.1.	Скорове при терапия с pegIFN+Riba.....	стр. 100
4.2.	Скорове при терапия с Омбитазвир/АВТ-450/ Ритонавир + Дазабувир ± Рибавирин.....	стр. 102
VI.	ДИСКУСИЯ.....	стр. 105
VII.	ИЗВОДИ.....	стр. 113
VIII.	ПРИНОСИ.....	стр. 114
	ЛИТЕРАТУРА.....	стр. 115

## **Използвани съкращения:**

### **На латиница:**

APRI- индекс на отношението АСАТ-тромбоцити за неинвазивна оценка на фиброзата (AST to Platelet Ratio Index)

AUROC – площ под кривата

СНС- хроничен хепатит С

DAA's – директно действащи антивирусни агенти

EVR- ранен вирусологичен отговор

ETR- отговор в края на лечението

FCI – Fibrosis- Cirrhosis Index

FIB-4- Fibrosis-4 индекс (за неинвазивна оценка на фиброзата)

Fpn1 – феропортин 1

GUCI – Göteborg University Cirrhosis Index

HAI- индекс на хистологична активност

HCC- хепатоцелуларен карцином

HCV- хепатит С вирус

HCV RNA- хепатит С-вирусна РНК

HGF-хепатоцитен растежен фактор

hsCRP- високо чувствителен С-реактивен протеин

NASH- неалкохолен стеатозен хепатит

NR- без отговор на лечението

PDGF - растежен фактор, произхождащ от тромбоцитите

Re- релапс

SOS FS- SOfia Simplified Fibrosis Score

SVR- траен вирусологичен отговор

TE - еластография

TGF-β1- трансформиращ растежен фактор бета 1

TNF-а- тумор некротизиращ фактор алфа

**На кирилица:**

АФ – алкална фосфатаза

А2МГ – алфа-2 макроглобулин

ЕЦМ- екстрацелуларен матрикс

ЗПФГ- значима перипортална фиброгенеза

## I. Въведение:

Вирусът на хепатит С е огромен обществен проблем и е водеща причина за развитието на хронична чернодробна болест, чернодробна фиброза и цироза. HCV е един от главните човешки патогени, инфектирайки повече от 170 милиона индивиди, средно 3% от човешката популация. Средно около 70% от тези инфектирани стават хронични носители. 2% до 5% от тези пациенти с HCV-индуцирана цироза развиват хепатоцелуларен карцином (HCC) (127). Хроничната HCV инфекция е основна причина за смърт от чернодробна болест и водеща индикация за чернодробна трансплантация. Според някои проучвания смъртността, свързана с HCV инфекция (смърт от чернодробна недостатъчност или хепатоцелуларен карцином) ще продължи да се увеличава през следващите десетилетия (78). Честотата на HCV инфекцията за България е около 1,5% (3).

Главният път за трансмисия на HCV инфекцията е кръвният. Рискови групи за развитие на хронична HCV инфекция са: лица, които използват и.в. наркотични в-ва; лица, които използват интраназални наркотични в-ва; лица, които са изложени на риск: дългосрочна хемодиализа; лица с направени татуировки в нестерилни условия; здравни работници; деца, родени от HCV-инфектирани майки; предходни реципиенти на трансфузионни продукти или органни транспланти и др. (95).

Диагнозата на хроничния хепатит С се базира на откриването и на HCV антитела и на HCV RNA при наличие на белези на хроничен хепатит, било то чрез завишени анимотрансфери или чрез хистология. Тъй като в случай на новопридобита HCV инфекция, спонтанният вирусен клирънс е много рядък преди 4 до 6 месеца от инфектирането, диагнозата хроничен хепатит С може да бъде поставена след този времеви период.

Количественото определяне на HCV е показано за пациенти, които може да бъдат подложени на антивирусно лечение. Количественото определяне на HCV RNA трябва да бъде направено чрез надежден и чувствителен метод с ниво на откриване 25 IU/ml или по-ниско (95). HCV генотипът също трябва да бъде определен преди започване на лечението. Уместно е и определянето на субгенотип, тъй като то дава съответна информация по отношение на различните степени на отговор и генетичните бариери при отговора на пегилиран интерферон, когато е използван като компонент на тройна терапия за генотип 1 инфекция.

Определянето на генотипа на IL28B на инфективния организъм може да даде полезна информация при вземането на клинично решение при селектирани пациенти с генотип 1 или 4. Благоприятният IL28B генотип (IL28b CC) идентифицира пациентите, които може в по-голяма степен да постигнат бърз вирусологичен отговор (RVR) и които имат значим шанс за излекуване с двойна терапия (59).

Тежестта на чернодробната болест, свързана с хроничната HCV инфекция, е ключов фактор, който определя първоначалната оценка на пациентите и по-нататъшното им проследяване. Чернодробната биопсия може да осигури обективна, полуколичествена информация относно количеството и строежа на колагена или съединителната тъкан в черния дроб, което може да подпомогне лечението и плана на мониториране. Скорът на фиброзата на METAVIR (F0-F4) и фиброзният скор на Ishak (0-6) са най-често използваните за оценка на количеството на чернодробния колаген. Чернодробната биопсия също може да помогне при оценката на тежестта на чернодробното възпаление или чернодробна стеатоза и да помогне да се изключат други причини за чернодробна увреда. Все пак процедурата има малък, но реален риск от усложнения и проблемите при пробовземането я правят малко желана при серийната ѝ употреба при повечето пациенти. Най-често използваните неинвазивни методи за определяне на тежестта на чернодробната болест, включват чернодробно насочен физикален преглед, рутинни кръвни тестове (в т. ч. серумен АЛАТ и АСАТ, албумин, билирубин, ИНР и пълна кръвна картина с тромбоцити), панели от серумни маркери за оценка на фиброзата, изобразителни методи (УЗ, КАТ) и еластография (95).

Вместо инвазивна чернодробна биопсия, все по-често се използват неинвазивни методи за оценка на чернодробната фиброза, дължащо се на лошият комплайънс на пациентите и ниската, но все още налична, смъртност след чернодробната биопсия. Неинвазивните тестове трябва да могат да разграничават несигнификантна (стадии F0-F1) от сигнификантна (стадии  $\geq$  F2) фиброза, в помощ на това да се отложи или започне антивирусно лечение. В допълнение, неинвазивните маркери трябва да могат надеждно да предсказват чернодробна цироза, за да бъдат проведени по-нататъшни диагностични методи за изключване на портална хипертония и за бъдат взети мерки срещу по-нататъшна прогресия на фиброзата. Неинвазивните стратегии, също така са основа за мониториране на болестта по време на лечение и идеално удостоверяват регресията на фиброзата за дълъг период (133).

Главната цел на терапията за хепатит С е постигането на траен вирусологичен отговор (SVR), т.е. неоткриваема HCV RNA на 12 или 24 седмица след лечението (59, 95). За нашата страна все още стандарт в терапията на хроничната HCV инфекция е комбинираното лечение с пегилиран интерферон и Рибавирин. Комбинираното антивирусно лечение ограничава възпалителните, некротичните и фиброзни промени, като при част от болните се негативира HCV RNA в серума (22).

Използваните днес антивирусни медикаменти не са лишени от странични ефекти. При лечение с пегилиран интерферон това са грипоподобен синдром, умора, главоболие, миалгия, психози, депресии, костно- мозъчна аплазия и др. (68, 135). Най-често срещаната нежелана реакция при лечение с Рибавирин е развитието на хемолитична анемия (221).

При лечението с пег-интерферон и рибавирин честотата на SVR е само 40-50% сред пациенти, инфектирани с генотип 1. След това лечение, терапията на хроничния хепатит С претърпя коренна промяна чрез въвеждането на лекарства, които действат директно на протеини, участващи в репликацията на вируса.

През 2011г. бяха лицензирани за употреба Телапревир и Боцепревир при HCV инфекция с генотип 1. Тези две лекарства са първа генерация директно действащи антивирусни препарати (DAAs), които са насочени срещу HCV NS3/4A серинова протеаза и по този начин се причисляват към групата на протеазните инхибитори, като и двата препарата трябва да се прилагат в комбинация с пегилиран интерферон и рибавирин. Този режим на тройна терапия е доказано ефективен при наивни пациенти и при такива, които са провеждали лечение до момента, включително нулреспондери при предходна двойна терапия с PegIFN/Рибавирин. Има и други DAAs на различен етап от тяхното разработване, някои от тях предназначени за HCV генотип 1, а някои и за другите генотипи. Тези лекарства включват втора генерация NS3/4A инхибитори на сериновата протеаза, нуклеозидни/нуклеотидни и не-нуклеозидни инхибитори на HCV RNA-зависимата RNA-полимераза, така също и NS5A инхибитори. Целта на новите терапевтични стратегии е в посока по-висока ефективност, активност при всички генотипи, скъсено време на лечение, лесно приложение и подобрена толерантност от страна на пациентите (59).

## **II. Литературен обзор:**

### **1. Показатели на възпалението:**

#### **- Биомаркери:**

Въпреки че все още не е идентифицирана молекула, която да е идеален маркер за чернодробна фиброза, полезно е да се имат предвид какви качества трябва да има идеалният биомаркер:

1. Да бъде специфичен за черния дроб;
2. Да бъде лесно достъпен и стандартизиран между всички лаборатории, които извършват диагностични биохимични /хематологични изследвания;
3. Да няма причина за фалшиво положителни резултати, като например дължащи се на възпаление;
4. Да могат да идентифицират стадия на фиброзата.

Идеалният/те биомаркер/и трябва да осигурява диагностицирането на фиброза в ранните ѝ стадии, позволявайки по този начин терапевтична интервенция за превенция на прогресията до цироза и НСС (74).

Повечето сегашни маркери не се специфични за черния дроб или може да символизируют нарушен чернодробен клирънс или пък се повлияват от налично възпаление. В допълнение, съпътстваща патология като хемолиза (предизвикваща спад на хаптоглобиновите нива и/или покачване на билирубиновите нива) или ревматоиден артрит (покачване на нивата на хиалуроновата к-на) са асоциирани с промени в нивата на серумните маркери.

Въпреки че не съществува идеален маркер, идентифицирани са няколко като възможни полезни индикатори на фиброза. Самостоятелно маркерите често корелират с фиброзата в големи групи от пациенти, но не са достатъчно предказващи, когато се касае за индивидуалния пациент, особено когато се използват за дълъг период от време (182). При тези неинвазивни методи може да настъпи припокриване между междинните стадии на фиброза и резултатите за оценка на фиброзата може да са сходни с тези на здрави индивиди (74). Поради тази причина в практиката се използват в комбинация, където те в по-голяма степен могат да разграничат минимална от значима фиброза. Голяма част от маркерите са компоненти на вече публикувани и валидирани серумни модели, използвани за предсказване на фиброзата (182).

### 1.1. Алфа 2-макроглобулин (A2MG):

A2MG е с молекулно тегло 718 kD и представлява хомотетрамерен гликопротеин в плазмата и екстрацелуларното пространство (62). A2MG е голям плазмен протеин, циркулиращ в кръвното русло. Продуцира се от черния дроб и е главен компонент на алфа-2 връзката при белтъчна електрофореза. Той също така е най-големият неимуноглобулинов протеин в плазмата. Молекулата на A2MG се синтезира главно в черния дроб, но също и локално от макрофаги, фибробласти и адренкортикални клетки. (21). Предполага се, че клетките на Ito играят голяма роля в интестиналната продукция на протеини като колагени и фибронектин и е демонстрирано, че Ito клетките на черен дроб от плъх са способни да експресират гена за A2MG в първични култури (147). A2MG се активира от протеази, с които той взаимодейства и тази протеолитична активация предизвиква промяна в конформацията му, която впримчва протеазата вътре в A2MG-хомотетрамера. В допълнение, A2MG има няколко независими домена, които функционират като носители на специфични растежни фактори и/или свързващи места за рецептори. Активацията на A2MG от протеази променя взаимодействието на A2MG с тези лиганди и индуцира клетъчно сигнализиране (62).

A2MG действа като антипротеаза и има способност да инактивира голямо разнообразие от протеинази. Функционира като инхибитор на фибринолизата чрез блокиране на плазмина и каликреина. Функционира също също като инхибитор на коагулацията, чрез блокиране на тромбина. A2MG може също да действа като носител на протеини, защото също така се свързва с множество растежни фактори и цитокини, като PDGF, основния фибробластен растежен фактор, TGF- $\beta$ , инсулин и IL-1 $\beta$ . Няма позната болест, която да е свързана със специфичен дефицит и никое състояние на болест не се дължи на ниски концентрации на A2MG. Концентрацията му нараства десетократно и повече при нефротичен синдром, когато други протеини с ниско молекулно тегло се губят през урината. Загубата на A2MG през урината се предотвратява чрез неговия голям размер. Крайният резултат е, че A2MG достига серумни нива равни или по-високи от тези на албумина при нефрозен синдром, който има ефект да поддържа онкотичното налягане. (21).

Алфа-2 макроглобулинът (A2MG) освен протеазен инхибитор, е и транспортер на цитокини. Той блокира множество протеази, включително трипсин, тромбин и

колагенази (62). А2МГ е въввлечен и в отключването на болестта на Алцхаймер, дължащо се на неговата способност да медира клирънса и деградацията на амилоид-бета, главен компонент на бета-амилоидните депозити (112).

В контекста на острофазов протеин, А2МГ се синтезира от хепатоцитите и стелатни клетки (147, 152). Неговите чернодробни и серумни нива се повишават в среда, където има засилена фиброгенеза (215). Когато има чернодробно възпаление или увреда, повишаването на А2МГ инхибира катаболизма на матриксни протеини и така причинява чернодробна фиброза (108, 215). Серумните нива на А2МГ нарастват заедно със стадия на фиброзата (147). Фиброгенезата и цитокин-индуциран хепатоцитен растежен фактор стимулират синтезата на А2МГ, докато инхибират синтезата на хаптоглобин (102).

Много студии са имали за цел да проследят поведението на А2МГ при хронична чернодробна увреда и в частност при хепатит С вирусна инфекция. З. Кръстев в своя дисертационен труд изследва индивидуалните серумни белтъци при различни групи чернодробно болни. По отношение на А2МГ, той установява непрекъснато повишаване на средните му стойности от чернодробна стеатоза, през ХПХ, ХАХ, като най-високи са при чернодробна цироза без асцит като израз на възпалителен отговор. При чернодробна цироза с асцит, стойностите на А2МГ са по-ниски от ХАХ и цироза без асцит, поради изчерпване на синтетичните възможности на черния дроб или наличието му в асцитната течност (5).

Gangadharan и сътр. (74) установяват, че А2МГ и имуноглобулините нарастват заедно с чернодробното увреждане, докато хаптоглобина и компонентите на комплемента се понижават. Серумните концентрации на А2МГ са с тенденция да нарастват с развитието на фиброзата.

Patel и сътр. (160) установяват високи нива на А2МГ при пациенти с умерена към тежка фиброза. Пациенти с хроничен персистиращ хепатит и цироза имат повишена плътност на лимфоцитите и фибробластите в чернодробна тъкан и повишени нива на серумния IgG и А2МГ (61). Roynard и сътр. (102) съобщават, че серумните маркери като А2МГ, хаптоглобин, ГГТ и общ билирубин може да имат предиктивна роля при прогресията на фиброзата и вирусологичния отговор при пациенти с СНС, без възможен вреден ефект на инвазивните методи като чернодробната биопсия. Но и сътр. (96) провеждат проучване за оценят предиктивната роля на неинвазивни серологични маркери като А2МГ, вит. Д свързващ протеин (VDBP) и аполипопротеин А1 (АpoА1).

Те откриват, че серумните концентрации на А2МГ са значимо повишени при умерена към тежка фиброза, въпреки че нивата на VDBP и ApoA1 са значимо по-високи при нормална находка или лека фиброза, в сравнение с тези с напреднала фиброза (и при двата случая  $p < 0.01$ )

Oguz и сътр. в своя студия за ролята на острофазови реактанти за отговора на антивирусна терапия при хроничен хепатит С, показват че нивата на А2МГ са значимо по-високи в група на пациентите ( $p < 0.05$ ) и значимо нарастват на 4-та седмица от лечението спрямо изходно ( $p < 0.05$ ). По този начин А2МГ заедно с другите острофазовите реактанти може да осигури допълнителна информация при оценката на отговора към антивирусна терапия (152).

А2МГ влиза в състава на множество комплексни системи за неинвазивна оценка на фиброзата: FibroTest, FIBROSpect II, Fibrometer, Hepascore, Liverscore и др. (12, 20, 43, 102, 160) Също така влиза в състава на създаденият от Косева и сътр. скор за неинвазивна оценка на фиброзата SOS FS, както и единствения скор за неинвазивна оценка на фиброгенезата GAMAGEN (4).

Зедно всички тези данни ясно подсказват, че А2МГ е най-информативният серумен биомаркер за чернодробна фиброза, което също така е потвърдено чрез мултиварибелен логистичен регресионен анализ (102).

## **1.2. Хаптоглобин:**

Хаптоглобинът е алфа-2 глобулин с молекулно тегло около 100 kDa (5). Полу-животът на серумния хаптоглобин е средно около 5 дни (139), но в присъствието на свободен хемоглобин (например при интраваскуларна хемолиза), комплексът хемоглобин-хаптоглобин, който се формира, се очиства много бързо от серума чрез моноцитно-макрофагната система, от което произхождат ниски или липсващи серумни нива на хаптоглобина. Хаптоглобинът представлява гликопротеин, който се състои от две леки алфа-вериги и две тежки бета-вериги. Генетичният полиморфизъм на алфа-веригите води до три фенотипа: Нр 1-1, Нр 2-1 и Нр 2-2, различаващи се по молекулното си тегло (123). Спадът на нивото на свободния хаптоглобин е показател за степента на интраваскуларна хемолиза (110, 227). В последно време са показани няколко функционални различия между фенотиповете на хаптоглобина, които изглежда имат важни биологични и клинични последствия. Полиморфизмът на хаптоглобина е

асоцииран с преобладаването и клиничната еволюция на множество възпалителни заболявания, включително инфекции, атеросклероза и автоимунни нарушения. Тези ефекти се обясняват чрез фенотип-зависимата модулация на оксидативния стрес и простагландиновия синтез. Нарастват и доказателствата, че хаптоглобинът е въввлечен и в имунния отговор също така. Силният генетичен натиск, фаворизиращ фенотип 2-2, предполага важната роля на хаптоглобина в човешката патология (115).

Също така комплексът хемоглобин-хаптоглобин предпазва от тубулно увреждане на бъбрека чрез инхибиране на екскрецията на хемоглобина през гломерулите (18, 118, 119, 120). По този начин повишеното натоварване с хемоглобин предизвиква изразен спад на измерения серумен хаптоглобин (91).

Хаптоглобинът също така е транспортен и острофазов протеин, който се синтезира в хепатоцитите и чиито концентрации се повишават от широко разнообразие от възпалителни състояния и нефрозен синдром. Той свързва хемоглобина в стабилен хаптоглобин-хемоглобинов комплекс (Hp-Hb) в случаите на патологично повишена интраваскуларна хемолиза (123).

Концентрацията на хаптоглобина се понижава при ин виво хемолиза, било то причинена от автоимунни, изоимунни или механични причини. Нивата му също се понижават с нарастване на стадия на фиброзата (102).

Като плазмен острофазов алфа-2 гликопротеин, хаптоглобинът има също антиоксидантни и имуномодулиращи свойства (38).

Тъй като се продуцира в черния дроб, нивата на Hp са понижени също и при хепатоцелуларни нарушения (200).

За да потвърдят знанието, че хаптоглобинът е протеин, който се продуцира като острофазов реактант при чернодробна фиброза, за предотвратяване на чернодробно увреждане, Zhang и сътр. използват патологичен миши модел на чернодробна фиброза, която е индуцирана от прилагане на въглероден тетрахлорид за 8 дена. Биоинформационен анализ показал, че експресията на хаптоглобин е асоциирана с фиброза и предполага, че хаптоглобинът е отговорен за прогресията на чернодробната фиброза (235).

В тяхното проспективно проучване, Imbert-Bismut и сътр. (102) оценяват предиктивната стойност на основни серумни биохимични маркери в помощ на диагнозата на клинично значима фиброза (включително ранни стадии). По техни данни, хаптоглобинът е във висока и отрицателна асоциация с фиброзата (24, 123), като тази

асоциация не е свързана с хемолиза, хиперспленизъм и чернодробна недостатъчност. Още повече, авторите не откриват асоциация с некоюгирания билирубин. Противоположните корелации с фиброзата на А2МГ (позитивна) и хаптоглобина (негативна), авторите обясняват с различната роля на хепатоцитния растежен фактор и TGF  $\beta$ 1 при фиброгенеза и острофазов отговор (89, 138, 219).

Както е описано при експериментална фиброза, нарастването на хепатоцитния растежен фактор може да е отговорно за неочакван спад в редуцията на TGF  $\beta$ 1, нарастване на А2МГ и спад на хаптоглобина. Трансдукция с гена на хепатоцитния растежен фактор супресира нарастването на TGF  $\beta$ 1 (219) и факторът стимулира синтеза на А2МГ (Guillen MI) и редуцира синтеза на хаптоглобин (89, 102, 138).

3. Кръстев също сравнява серумния хаптоглобин при различни чернодробни заболявания, като установява тенденция за по-високи от контролните средни стойности най-достоверно при чернодробна стеатоза и хронични хепатити. Стойностите обаче спадат статистически значимо при напредване от чернодробна стеатоза към чернодробна цироза с асцит, поради увреждане на възможностите на черния дроб за производство на хаптоглобин (5).

Gangadarhan и сътр. потвърждават, че хаптоглобинът се понижава при чернодробна фиброза (74). Ahmed и сътр., (15) с цел да се редуцира използването на чернодробна биопсия, проучват корелацията на индекс от биохимични маркери с хистологичните белези на фиброзата при пациенти с хепатит С вирусна инфекция (HCV) и/или неалкохолен стеатохепатит (NASH) с или без шистозомиаза. Студията показва, че хаптоглобинът е негативно свързан със степента на чернодробна фиброза при две от групите изследвани пациенти, което е в съответствие с резултати от други студии. (11, 12, 102, 182), които показват подобна негативна корелация. Тъй като паренхимните клетки на черния дроб са отговорни за синтеза на серумните протеини, включително и хаптоглобина, ниските серумни нива на може да съпътстват чернодробната болест, когато капацитетът на черния дроб за синтез е увреден. Следователно, определянето на серумния хаптоглобин може да бъде от полза при определянето на степента на прогресия на хепатоцелуларната увреда (94). Поради тази причина, авторите заключават, че А2МГ, хаптоглобинът и аполипопротеин А1, както и APRI индексът и модифицираният APRI индекс, се оказват значими предиктори на фиброза. (15).

Хаптоглобинът, като А2МГ, влиза в състава на вече патентовани и утвърдени в клиничната практика комплексни системи за неинвазивна оценка на чернодробната фиброза-FibroTest (102); SOS FS (4).

В студии, проведени предимно при популации без хемолитични нарушения, ниските нива на Нр са установени при HCV инфектирани пациенти с или без фиброза, сравнени с неинфектирани контроли (23, 24).

Васq и сътр. изследват серумните нива на хаптоглобина при пациенти с хроничен хепатит С и установяват, че те са значително по-ниски при пациентите с HCV инфекция, отколкото при здравите контроли (0.56 +/- 0.36 срещу 0.90 +/- 0.35 g/L, P < 0.001). При пациенти с хроничен хепатит, но без цироза, хаптоглобиновите серумни нива са понижени също така. Отбелязват и негативна корелация на хаптоглобина с индекса на хистологична активност на Knodell (p<0.001) и специално със скората на фиброзата (P < 0.001) и перипорталната некроза (P < 0.05) (24). По отношение на промените в хаптоглобиновите нива вследствие на лечение, Hung и сътр. описват корелация между трайният вирусологичен отговор (SVR) и периода на изразена анемия по време на комбинирана антивирусна терапия (r=0.774, p=0.003), особено при пациенти с генотип 1 (r=0.960, p<0.001) (100). Тъй като се знае малко за факторите, влияещи на рибавирин-индуцираната анемия, група белгийски учени са опитали да потърсят тези променливи в голяма група от пациенти с хепатит С, лекувани с комбинирана терапия-индукционно лечение (ежедневна доза интерферон) и стандартна за този етап терапия (интерферон три пъти седмично). И двете групи получавали 1000-1200 мг рибавирин от 4-та седмица до края на лечението. След мултивариабилан анализ, авторите установяват, че спадът в нивата на хемоглобина единствено значимо е повлиян от изходния брой на тромбоцитите, приложеното количество интерферон и фенотипа на хаптоглобина. Дозата на Рибавирин не е повлияла спада на хемоглобина, както и ранния вирусологичен отговор (221).

### 1.3. CRP

С-реактивният протеин (CRP) е ануларен (с форма на кръг) пентамерен протеин с молекулно тегло вариращо от 110,000 до 144,000 Да. Експресията му се регулира на транскрипционно ниво от интерлевкин-6, който е главният индуктор на гена по време на остра фаза на възпалението (222). Експресията на CRP в хепатоцитите е тясно свързана и с други проинфламаторни цитокини, като например TNF- $\alpha$ , интерлевкин-1.

CRP, който е един от главните острофазови протеини, е продуциран от черния дроб, също може да е медиатор на тъканна увреда (222). Неговите концентрации нарастват бързо в отговор на тъканна увреда, инфекции и други възпалителни феномени, като автоимунни и злокачествени заболявания.

Физиологичната роля на CRP е да свързва лизофосфатидилхолина, експресиран на повърхността на мъртви или умиращи клетки (и някои видове бактерии) с цел активиране на комплементната система чрез C1Q-комплекса (213). За разлика от IgG, който специфично разпознава определени антигенни епитопи, CRP разпознава увредени собствени и чужди молекули. Това позволява ранна защита и води до проинфламаторен сигнал и активация на хуморалната адаптивна имунна система.

Концентрацията на CRP се влияе от индекса на телесната маса (BMI), наличието на захарен диабет, артериална хипертония, тютюнопушене, естроген-заместваща терапия, ревматоиден артрит, хронични белодробни болести, остри вирусни инфекции (56).

Основната биологична функция на CRP е защитата на гостоприемника срещу бактериални патогени и клирънс на клетки, претърпяли апоптоза или некроза.

Въпреки че не е специфичен биомаркер, неговите концентрации нарастват бързо в отговор на тъканна увреда, инфекции и други възпалителни феномени, като автоимунни и злокачествени заболявания (161). Серумните нива на hsCRP са повишени при пациенти с инсулинова резистентност и корелират с метаболитния синдром (180, 234). По-високата чувствителност на hsCRP различно от „обикновения“ CRP е отразена чрез по-ниска минимална референтна стойност както и по-тесен обхват на референтните стойности (от 0 до 1 мг/л, сравнено с „обикновения“ CRP- 0 до 5 мг/л). Така че, неговата предсказваща стойност е много по-точна, имайки предвид бъдещи сърдечно-съдови патологични инциденти при базисно здрави индивиди (134).

От хепатологична гледна точка, hsCRP е чернодробно специфичен острофазов протеин и неговата експресия в хепатоцитите е тясно свързана с проинфламаторни цитокини, като например TNF- $\alpha$ , интерлевкин-1 и интерлевкин-6 (114). Известни са противоречиви резултати относно асоциацията на нивата на CRP и anti-HCV серопозитивност при различни групи пациенти (66, 107, 143, 179, 218, 231).

Нивата на CRP растат паралелно с прогресията на хроничната чернодробна болест, сравнено преди началото на прогресията, за това е полезен прогностичен параметър (197). Интересно е, че концентрациите на hsCRP спадат линейно с

покачването на серумния билирубин. Също така се забелязва кохерентно покачване на концентрациите на hsCRP при наличие на неалкохолен стеатохепатит (NASH), чест спътник на хроничния С хепатит (СНС) (153).

Popović-Dragonjić и сътр. показват, че стойностите на hsCRP са статистически значимо повишени при СНС пациенти в сравнение със здрави контроли ( $p < 0.05$ ), а още повече при пациенти с СНС и лека стеатоза, в сравнение с тези с СНС без стеатоза ( $p < 0.001$ ). Според авторите hsCRP може да бъде смятан на прогностичен фактор при прогресията на СНС в полза на това да бъде проведен навременен и специфичен терапевтичен подход при лица с СНС много преди да прогресира болестта (168).

Скорошно проучване показва, че HCV-инфектирани пациенти, които започват лечение с интерферон алфа-2b, имат по-нисък изходен CRP, отколкото неинфектирани контроли (107). Floris-Moore et al. докладват асоциация на по-ниски нива на серумни липиди и CRP с HCV-инфекция при HIV-инфектирани мъже (66). В допълнение, Skowronski et al. докладват, че нивата на CRP при HCV –пациенти с диабет, са по-ниски отколкото при дабетици без HCV-инфекция (201). Противоположно на това, Huang et al. показват, че средното ниво на hsCRP при пациенти с хронична HCV-инфекция е значимо по-високо от това на здравите контроли (99). Сегашните данни сочат, че hsCRP не корелира с титъра на серумната HCV RNA. По този начин се предполага, че други фактори, а не вирусната репликация, може да допринасят за HCV-асоциираната редукция в нивата на hsCRP. Нарушената чернодробна функция, свързана с хроничен хепатит С, може да доведе до подтисната продукция на hsCRP (49).

Пациентите с хроничен вирусен хепатит имат завишени нива на IL-1 и TNF- $\alpha$  и завишени нива на цитокините, които стимулират продукцията на CRP. Huang и сътр. (99) описват значимо по-високи нива на високо сензитивния CRP (hsCRP) в студия, проведена върху 95 пациента с СНС и 95 здрави контроли и също така пациентите с СНС постигат значим спад в нивата на hsCRP след лечението с пегилиран IFN и рибавирин, най-вече при 68 пациента, които постигат траен вирусологичен отговор ( $0.25$  срещу  $0.64$  mg/L,  $P < 0.001$ ). В студията на Oguz и сътр. относно предиктивната роля на острофазови реактанти за отговора на антивирусна терапия при пациенти с хроничен хепатит С, нивата на CRP са сходни при пациенти с СНС и контролната здрава група, въпреки че спадът в нивата на CRP между първоначалното определяне, 4-та седмица и 12-та седмица, е значимо ( $p = 0.005$  и  $p = 0.014$ , респективно) (152).

Пациентите с СНС, които приемат и алкохол, имат понижен отговор на терапия с IFN и значимо по-високи нива на CRP отколкото пациенти с СНС, неприемащи алкохол, при последваща терапия с IFN. (Ono K). Lapinski и сътр. (116) провеждат студия при 20 пациента с СНС, които провеждат лечение с IFN- $\alpha$ -2a и не описват значима разлика между CRP и нивата на албумина на 2-ра и 12-та седмица. Oguz и сътр. не наблюдават значима разлика между респондери и нонреспондери по отношение на нивата на CRP при изходното определяне и на 12-та седмица. Повишението на CRP е значимо между изходните нива и тези на 4-та и 12-та седмица, въпреки това, разликата между изходните нива и тези на 48-ма седмица са незначими. В контраст с предходни доклади, авторите смятат приложението на IFN за причина за повишението на нивата на CRP (152).

#### **1.4. Желязна обмяна и значението ѝ за чернодробното възпаление:**

Обмяната на желязото в условията на чернодробна увреда е обект на проучване от много изследователи. Доказано, че желязото е важен елемент в естественото протичане на хроничната HCV инфекция. Серумните маркери на желязния метаболизъм са обикновено повишени при хронична HCV инфекция (51, 75, 198, 207, 212, 220). Много студии са имали за цел да открият причините и ефектите на това свръхнатоварване с желязо при пациенти с хронична HCV инфекция. Обобщено, некроинфламаторната активност чрез съпътстващата вирусна репликация, са считани за най-важните причини за биохимичния и тъканен желязен излишък (51). Също така е изказана хипотеза, че вирусната инфекция самостоятелно или чрез активация на цитокини може да модифицира желязния транспорт и метаболизъм в хепатоцитите. Експериментални и клинични данни сочат, че желязният излишък може да екзацерира чернодробното увреждане при пациенти с HCV, повишавайки риска от чернодробна фиброза и цироза, да подпомогне развитието на хепатоцелуларен карцином и да предотврати постигането на продължителен вирусологичен отговор към антивирусната терапия (51). Отговорът на комбинираното антивирусно лечение е в негативна връзка с повишеното желязно натрупване, но точните механизми на тази връзка остават неизяснени (212).

При оценка на промените в желязната обмяна при различни чернодробни заболявания, Пенкова и сътр. установяват, че при хронични чернодробни заболявания се откриват отклонения във всички серумни показатели на желязната обмяна –

повишени серумно желязо, ЖСК, феритин и насищане на трансферина, както и намаление на хепсидина в сравнение със здрави лица. Разгледани поотделно промените в параметрите на желязната обмяна, най-чести и приблизително в еднаква степен са отклоненията в серумното желязо и хепсидина, последвани от тези на феритина и сатурацията на трансферина. При хроничен хепатит С, в най-голяма степен е отклонен (намален) серумният хепсидин (53%), последван от повишено серумно желязо (42%). Повишено насищане на трансферин и феритин се откриват в еднаква степен - 29%. От гледна точка на хистологичните промени, също установява връзка между хистологичната тежест на чернодробното увреждане и серумните параметри на желязната обмяна. Промените се задълбочават при нарастване на стадия на фиброзата и са най-изразени при напреднала фиброза. Пенкова и сътр. показват, че честотата на синдрома на пренасищане с желязо, оценена според стандартните серумни маркери е 18% на базата на повишено трансфериново насищане и 11% - въз основа на промени във всички серумни маркери.

Въпреки разнопосочността между сидерозата и серумните маркери за желязна обмяна, около 20% от болните с ХЧЗ имат синдром на претоварване с желязо и хемосидероза. Това е изцяло за сметка на болните с неалкохолна и алкохолна стеатозна болест и хроничен хепатит С (8).

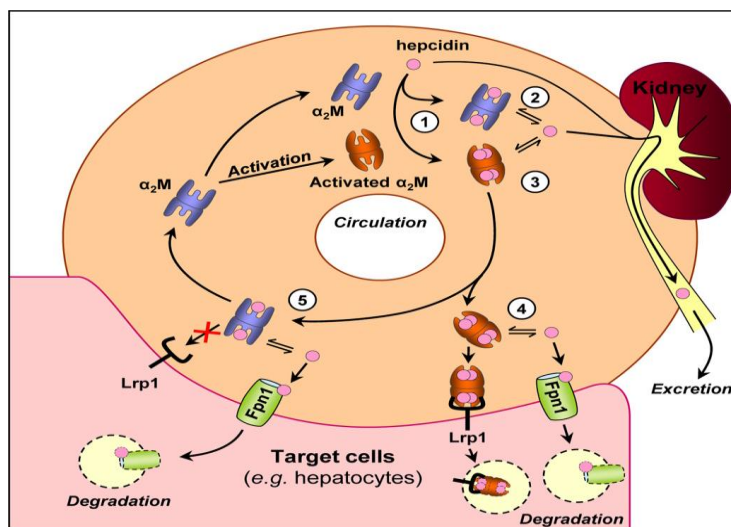
Някои проучвания (128, 185) показват, че няма асоциация между наличието на желязно отлагане в черния дроб и стадия на фиброза. Други пък показват, че отлагането на желязо в черния дроб е свързано с тежка чернодробна фиброза (31, 79, 136). Още повече, експериментални данни сочат, че отлагането на желязо може да отключи активация на чернодробните стелатни клетки и така да индуцира чернодробната фиброза (128). Casaril et al. (45) изказват предположение, че дори слабо покачване на нивата на желязо в серума и отлагането на желязо в черния дроб, може да влоши протичането на хроничната HCV инфекция и да ускори прогресията на фиброзата.

#### **1.4.1. Прохепсидин/ хепсидин - маркер на желязната обмяна, както и на възпалението**

Човешкият хепсидин се продуцира в хепатоцитите като съдържащ 84 амонокиселинни остатъка пре-прохепсидин (166), който се трансформира в биологично активната форма, съдържаща 25 аминокиселинни остатъка (хепсидин- 25), секретирана

в плазмата (159). Huang и сътр. (98) откриват, че хепсидинът предпочитано се свързва с кръвен гликопротеин- алфа-2 макроглобулин и това се потвърждава последователно и независимо един от друг от две други групи изследователи (103, 187). Друга предварителна студия сочи, че А2МГ свързва само малка фракция от тоталния хепсидин в кръвта (103). Известно е, че активността на А2МГ в инхибирането на протеази се медира чрез свързването на протеазите за „регион-примамка“ към А2МГ, което води до конформация към неговата активна форма (36) и това може да бъде имитирано чрез лечение с метиламин (163, 188, 202).

В своята студия Huang и сътр. демонстрират, че А2МГ действа като носител на хепсидина, който забавя неговата екскреция през бъбрека и така повишавайки неговата ефикасност в сравнение с несвързания хепсидин, който е с ниско молекулно тегло. На фигурата по-долу е представен модел, който обяснява доставянето на хепсидина до Fpn1 и също така неговото наличие в урината, което е медирано чрез лабилното свързване на хепсидина с А2МГ или А2МГ-МА (98).



**Фигура 1.** Схематичен модел, илюстриращ как А2МГ в неговите естествена и активирана форма, действа като протеин-носител на хепсидина в циркулацията. 1) Хепсидинът в циркулацията се свързва с нативният А2МГ и много по-малката пропорция на активирания А2МГ, който е представен при физиологични условия (103, 163, 187) ; 2) Свободният хепсидин в равновесие с този, свързан с А2МГ, може да бъде екскретиран през бъбреците благодарение на своето ниско молекулно тегло (около 2.8 kDa). 3) Свързването на хепсидина с високо молекулния (около 725kDa) А2МГ или активирания А2МГ, забавя бъбречната филтрация. 4) Хепсидинът, свързан за

активирания А2МГ, се свързва за рецептора на А2МГ (Lrp1) на таргетните клетки, които потенциално се улесняват за експозиция на Fpn1 и Lrp1 може да бъде интернализиран. 5) В контраст на активирания А2МГ, нативният не е свързан с Lrp1 (36), като по този начин се удължава полу-животът на свързаният хепсидин и се удължава експозицията на Fpn1 (98).

Хепсидинът е ключов регулатор на системната желязна хомеостаза (165, 207). Той е свързан чрез down- регулация с желязното нахлуване от червата и макрофагите чрез интеракция с главния желязен експортен протеин при бозайниците- феропортин (22, 72). Доказано е, че хепсидинът се свързва с феропортина и води до неговата деградация. От това следва понижена феропортинова продукция и намален желязен пул от ентероцитите и макрофагите. Това става при високи нива на циркулиращия хепсидин, а именно при желязно претоварване и възпаление, които са основните стимули за неговата продукция (22).

Хепсидинът също така е и острофазов протеин с антимикробна активност, която нараства заедно с отговора на инфекцията и възпалението (148). Синтезът на хепсидин в черния дроб е чувствителен към нивата на желязо в тялото- повишаване- при претоварване с желязо и понижаване-в случаи на желязен дефицит.

Нарастващи доказателства насочват вниманието към потенциалната поява на дисрегулация в хепсидиновата система при пациенти с хронични вирусни хепатити. Докладвано е, че серумните прохепсидинови нива са по-ниски при хронична хепатит С и хронична хепатит В-вирусна инфекция и са негативно асоциирани с тоталните желязни нива (142). В допълнение, по-рано е показана отрицателна връзка между серумния прохепсидин и степента на чернодробна дисфункция (105).

Предполага се, че намалената експресия на хепсидин при хронична HCV инфекция се дължи или на мутации в хепсидиновия ген (165, 220) или на негативното влияние на оксидативния стрес (72).

Много студии имат за цел да проучат влиянието на хроничната чернодробна увреда върху серумните концентрации на прохепсидина и хепсидина. Пенкова и сътр. сравняват стойностите на серумния хепсидин при здрави лица и различни групи пациенти с чернодробни заболявания (9, 162). Наблюдавани са значително по-ниски стойности на хепсидина при цялата група пациенти с хронични чернодробни заболявания (алкохолна чернодробна болест, неалкохолна стеатозна чернодробна болест, хроничен хепатит С) ( $82.9 \pm 40.74$  ng/ml) спрямо контролите ( $99.14 \pm 32.94$  ng/ml,

$p=0.005$ ). Също така е отбелязана противоположна връзка между нивата на хепсидин от една страна и нивата на желязото, феритин, чернодробните ензими, някои от параметрите на чернодробната функция, както и със степента на депозиция на желязо в черния дроб и тежестта на стеатозата, възпалението и фиброзата (0.01-0.001).

И в други клинични студии се доказва, че при хронична HCV инфекция е намалена експресията на хепсидин (72). Отношението хепсидин/ серумен феритин е значимо по-ниско при HCV (+) група ( $26.8 \pm 15.4$ , median 23.3) отколкото в HBV (+) група ( $46.5 \pm 41.0$ , median 31.6;  $P = 0.0129$ ) или HCV (-) HBV (-) група ( $44.7 \pm 33.7$ , median 34.0;  $P = 0.0080$ ).

Jaroszewicz и сътр. наблюдават значително намаление на прохепсидина по време на антивирусна терапия с пегилиран интерферон и рибавирин. Те наблюдават постепен спад на прохепсидина при отговорили на терапията инфектирани с генотип 1 лица с хроничен хепатит С ( $p= 0.04$ ). При нон-респондери на се наблюдава такъв спад. При лица с генотип 3 има подобна асоциация, със статистически значим спад на прохепсидина само в групата на респондерите ( $p=0.01$ ). Авторите отбелязват, че HCV RNA на 12 седмица от терапията корелира позитивно изходните ( $R = 0.63$ ,  $P < 0.005$ ) и тези на 12-та седмица ( $R =0.60$ ,  $P = 0.01$ ) серумни прохепсидинови концентрации при инфекция с генотип 1. Според Jaroszewicz и сътр. HCV-инфекцията вероятно има директен ефект върху желязния метаболизъм и нивата на прохормона на хепсидина, което обяснява спада на серумния прохепсидин при успешна ерадикация на HCV чрез антивирусно лечение (106).

Според данните на Galal и сътр., с нарастване на степента на некро-инфламаторната активност, се открива значима редукция на серумния прохепсидин. Това отчасти е съвместимо с Olmez et al. (154), които докладват значима отрицателна корелация между серумните прохепсидинови нива и хистологичната активност. От друга страна, Nagashima et al. (142) и Girelli et al. (82) не намират такава корелация. В съгласие с Girelli et al., въпреки значимата редукция на серумния прохепсидин при пациенти с напреднала фиброза в сравнение с тези с лека фиброза, авторите не намират значима корелация между серумните прохепсидинови нива и стадия на фиброзата. На противната страна, в други проучвания (10, 142, 154) е докладвана значима обратна корелация между серумния прохепсидин и стадия на фиброзата. Скорошно проучване (10), сочи, че в ситуация на нарушена чернодробна функция, хепсидиновата синтеза както и активността или експресията на конвертиращи ензими може да е нарушена и да

повлияе концентрацията на циркулиращия прохепсидин. От това откритие може също така се предположи, че интерференцията на HCV с хепсидиновата синтеза е на ниво на синтез на прохормон или на фаза на развитие в черния дроб. Тези резултати предполагат, че прогресията на чернодробната фиброза повлиява синтезата на хепсидин и неадекватната продукция на хепсидин може да обясни голямото желязно свръхнатоварване, което играе главна роля в чернодробната фиброза (73). Vekri et al. (32) и Fujita et al. (72) предполагат, че хронично ниският прохепсидин при пациенти с хепатит С благоприятства повишеното желязо в хепатоцитните депа.

От изброеното до тук може да се заключи, че желязната обмяна и в частност нивата на хепсидина, са от изключително важно значение за напредването на чернодробната болест и оценката им може да бъде от помощ проследяване на болни с хепатит С, както и за мониториране на ефекта от антивирусно лечение.

### **1.5. Албумин, глобулини, имуноглобулини:**

Албуминът отговаря за 75% от плазменото онкотично налягане и количествено е най-важният плазмен протеин. Продуцира се изключително от хепатоцитите. Средностатистически възрастен продуцира 12-15гр албумин/дн., количество, което представлява по-малко от 5% от общия албуминов пул в тялото. Дългият полуживот (около 20 дни) на албумина, заедно с големия му запас в тялото, го правят ненадежден индикатор на чернодробната синтетична функция при пациенти с остра чернодробна увреда. От друга страна, при пациенти с хронична чернодробна болест, нивата на серумния албумин са добро отражение на чернодробната синтетична функция. Наличието на асцит при пациенти с цироза може да намали концентрацията на албумина в серума вторично чрез нарастване на обема на разпределение.

Глобулините формират другият главен компонент на плазмените протеини. Глобулиновите нива са повишени при хронична чернодробна болест вероятно като резултат на невъзможност на ретикуло-ендотелните клетки на чернодробните синусоиди да очистват от порталната циркулация антигените, нахлуващи от червата (81).

Серумните нива на имуноглобулините се определят рутинно в клиничната практика, защото те доставят ключова информация за хумаралния имунен статус. Ниските имуноглобулинови нива дефинират някои хуморални имунодефицитни състояния (40). В контраст, високи имуноглобулинови нива (поликлонална гамапатия),

са наблюдавани при чернодробни заболявания, хронични възпалителни заболявания, хематологични нарушения, инфекции и малигнени заболявания (57). Още повече, нивата на имуноглобулините помагат в диагнозата на някои заболявания, в частност-чернодробните. Също така, серумните концентрации на имуноглобулините нарастват с възрастта (80, 125, 205).

Един от на-характерните белези на чернодробното увреждане е диспротеинемията. У чернодробно болните нивото на серумните белтъци отразява едновременно наличието на възпалителни изменения в самия черен дроб и способността на хепатоцитите да произвеждат белтъци (5).

Хипергамаглобулинемията се смята за маркер на хистологично авансирала форма на фиброза (132) и може да играе роля в прогресията на чернодробната болест (224). Предполага се, че хипергамаглобулинемията при хронични чернодробни заболявания е в резултат на намалено отстраняване на имуноглобулините от болния черен дроб (209).

Фибробластната пролиферация и колагеновата продукция се увеличават *in vitro* от няколко растежни фактора, каквито са трансформиращият растежен фактор b1 (TGF-b1), произхождащия от тромбоцитите растежен фактор (PDGF) и фибробластния растежен фактор (FGF) (27, 65, 181, 203). Продукцията на тези растежни фактори се увеличава в участъци на фиброза (35, 129, 144), което предполага потенциалната роля на тези фактори в развитието на фиброзата. IL-6 може да намали *in vitro* албуминовата продукция от хепатоцитите (46, 93).

Natsume и сътр. индуцират чернодробна фиброза при мишки чрез инжектиране на карбон тетрахлорид (CCl<sub>4</sub>) за повече от 10 седмици и установяват повишена генна експресия на IL-6 и откриват имунорекативен IL-6 в инфилтрираните възпалителни клетки. За да очертаят ролята на IL-6 в този процес, авторите третират дефицитни на IL-6 мишки с CCl<sub>4</sub> по сходен начин за 12 седмици, при което фиброзните промени са по-леко изразени и серумните албуминови нива са по-ниски при IL-6 дефицитните мишки, отколкото при дивия тип мишки. По-натаък, CCl<sub>4</sub>-индуцираната експресия на гените на TGF-β1 и хепатоцитния растежен фактор в черния дроб, е значимо редуцирана при IL-6-дефицитни мишки. По този начин авторите показват, че IL-6 може да много силно въввлечен във фиброзните промени и в поддържането на серумните албуминови нива. (145).

Активираниите чернодробни стелатни клетки играят ключова роля в чернодробната фиброза и инактивирането им се смята за обещаващ терапевтичен резултат. Много скорошно прочуване показва, че албуминът има и антифиброгенен ефект (121).

Още едно потвърждение на връзката на албумина с чернодробната фиброза, правят Ali и сътр. Те изследват ефекта на трансплантирани костно-мозъчни стволови клетки върху карбон тетрахлорид (CCl<sub>4</sub>)-индуцирана чернодробна фиброза при мишки. 4 седмици след трансплантацията на костно-мозъчните стем клетки, мишките имали значимо редуцирана чернодробна фиброза, в сравнение с мишки, третирани с CCl<sub>4</sub>, оценено чрез оцветяване със Sirius-червено. Също така се наблюдавала значима подобрена експресия на албумин, в сравнение с мишки, третирани с CCl<sub>4</sub> самостоятелно. Тези открития пък засилват концепцията за клетъчна терапия на чернодробната фиброза (17).

По отношение на значението на имуноглобулините за прогресията на чернодробното увреждане, в една стара студия на Feizi и сътр., са определени серумните нива на имуноглобулини G, A и M при пациенти с различни чернодробни заболявания и наблюдават значимо повишени нива на IgG, IgA и IgM сред пациентите в почти всички диагностични групи (63).

В студията на Imbert-Bismut и сътр. серумната концентрация на гама-глобулините, макар и по-ниска от пациентите с цироза, е по-висока при пациенти с нециротична фиброза, отколкото при тези със скор F1 или F0 (102).

Fallatah и сътр. откриват, че пациенти с хронични чернодробни заболявания с декомпенсирана цироза имат значимо по-високи серумни нива на IgG в сравнение с компенсирани пациенти ( $p < 0.02$ ), а пациентите с АИХ имали значимо по-високи серумни нива на IgG, отколкото пациентите с неавтоимунни чернодробни заболявания и пациентите с декомпенсирана цироза в същата група ( $p < 0.001$  и  $p < 0.044$ , респективно) (60).

При оценката на серумните нива на IgG, IgA и IgM при хроничен хепатит C, сравнени с нециротична алкохолна чернодробна болест и здрави контроли, е установено, че серумните нива на IgG са повишени при пациенти с хроничен хепатит C в сравнение с двете групи – алкохолици ( $p < 0.001$ ) и здрави контроли ( $p < 0.001$ ), а между алкохолици и контроли били със сходни стойности (83).

В светлината на предсказването на прогресията на фиброзата при хроничен хепатит С, Ortak и сътр. определят нивата на IgG, IgA и IgM като възможни индикатори на фиброза измежду пациенти с хронична HCV инфекция. Данните от тази студия сочат, че има значима връзка между серумните нива на IgG, IgA и тежестта на чернодробна фиброза сред пациенти с хронична HCV инфекция (157).

При оценката на кандидати за биомаркери за чернодробна фиброза при пациенти с хроничен хепатит С, Gangadharan и сътр. наблюдават спад на хаптоглобин, преалбумин и албумин при чернодробно увреждане и нарастване на тежката верига IgG, Ig κ/λ верижните региони и IgA (74), което е в съгласие и с други студии (84, 102, 151, 233). Това е вероятно защото серумните протеини варират дори сред пациенти с една и съща степен на чернодробна увреда, най-вече поради вариации в диетата, състоянието на гладно и постпрандиалното състояние (189).

В своя анализ на индивидуалните серумни белтъци при различни чернодробни заболявания, З. Кръстев установява, че средните стойности на серумния албумин се понижават със задълбочаване на чернодробното увреждане. При чернодробна цироза без асцит авторът наблюдава запазени средни стойности на албумина, вероятно поради наличието на функционални резерви. При чернодробна цироза с асцит екстравазалното преразпределение на албумина е причина за ниските му стойности, а при хроничен активен хепатит-поради намалени възможности за синтез. По отношение на IgG, Кръстев наблюдава повишение на серумните му нива с напредване на чернодробното увреждане, като високите стойности при наличието на асцит вероятно се дължат в голяма степен на извънчернодробни фактори- отговор на хронично антигенно дразнене (5).

Серумните албумин и имуноглобулин G влизат в състава на единствения известен на този етап неинвазивен маркер за оценка на фиброгенезата, какъвто е GAMAGEN индексът (4).

### **1.6. Цитокини, участващи в чернодробното възпаление - TNF-α:**

Тумор некротизиращият фактор алфа (TNF-α) е цитокин, продуциран основно от активирани моноцити и лимфоцити, който има плеотропни свойства (48). TNF се продуцира първично като съдържащ 233 аминокиселинни остатъка тип II трансмембранен протеин, организирани като стабилни хомотримери (113, 210).

Смята се, че TNF се продуцира първично от макрофаги, но също така и голямо разнообразие от клетки, включително лимфоидни клетки, мастоцити, ендотелни клетки, сърдечни миоцити, мастна тъкан, фибробласти и неврони (206). Голямо количество от TNF се освобождава в отговор на липополизахариди, други бактериални продукти и IL-1.

Апоптозата е ключов елемент в защитата на организма-гостоприемник срещу вирусни инфекции, инхибирайки вирусното размножаване и устойчивост. (194, 226). Хепатит С вирусният (HCV) ядрен протеин играе роля на регулатор на генната експресия и има потенциал да подтиска началото на клетъчната апоптоза (175, 176, 177). Независимо едни от други автори са показали, че ядреният HCV-протеин подтиска апоптозата, медирана от тумор некротизиращия фактор-алфа (TNF- $\alpha$ ) (-131, 178, 186).

TNF-алфа участва в индукцията на имунния отговор към инфекциозни агенти и е доказано, че притежава директен антивирусен ефект (150, 184, 229). Въпреки че ниски нива на TNF-а може да допринесат до протекция на клетката, екцесивните количества може да причинят клетъчна увреда (29, 48).

TNF-а е въввлечен в патогенезата на множество състояния на черния дроб, включително вирусен хепатит (33, 53, 55, 88, 137, 140, 141, 195, 232). Наблюдавана е повишена продукция на TNF-а от периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMC) при фулминантен вирусен хепатит (232), хроничен хепатит В и хроничен хепатит С (195, 216, 232).

В допълнение, TNF потенциално може да повлияе чернодробната фиброгенеза чрез стимулация на чернодробните stelatни клетки, които са основните клетки, участващи в този процес (69).

За доизясняване на ролята на TNF-а системата в патогенезата на HCV-инфекцията, Nelson и сътр. изследват плазма, серум и мононуклеарни клетки в периферна кръв при пациенти с СНС и здрави контроли и определят циркулиращия TNF-а и TNF-рецептори и TNF-а mRNA. В резултат откриват, че пациентите с хронична HCV инфекция имат по-високи нива на циркулиращия TNF-а, в сравнение със здравите контроли (9.62 +/- 6.01 срещу 3.66 +/- 1.23 pg/ml, P < 0.001), по-високи циркулиращи нива на TNF рецептори, в сравнение на контролите (P < 0.001) (149).

В опит да проучат връзката на TNF-а и отговора на антивирусна терапия, Larrea и сътр. анализират експресията на гена за TNF-а при пациенти с хроничен хепатит С. По

този начин те открили завишени серумни нива на TNF-a при всички пациенти с хроничен хепатит С, вкл. и тези случаи, представляващи трайна биохимична ремисия на болестта след интерферонова терапия. Нелекувани пациенти с хроничен хепатит С показали повишени нива на TNF-a mRNA в черния дроб и мононуклеарни клетки, в сравнение със здрави контроли. След завършването на лечението с интерферон, пациентите постигнали траен пълен отговор, достигнали нива на TNF-a mRNA и в черния дроб и в периферните мононуклеарни клетки, близки до нормалните нива, значимо по-ниски от пациентите, които не отговорили на интерферона и от тези с пълен отговор, които релапсирани след спирането на интерферона. Установено е, че високите нива на TNF-a са асоциирани с генотип 1b. Според авторите, при HCV инфекция има повишена експресия на TNF-a, а високите нива на този цитокин може да играят роля в резистентността към интерферонова терапия (117).

## **2. Фиброза и оценката ѝ:**

Хроничното чернодробно заболяване уврежда черния дроб и последващият необратим процес може да доведе до чернодробна фиброза и непосредствено развитие на цироза. Чернодробната фиброза се характеризира с екцесивно образуване на съединителна тъкан в черния дроб. Тази акумулация на екстрацелуларен матрикс (ЕЦМ) променя чернодробната морфология. Различните видове колаген са главните компоненти на ЕЦМ при фиброза. Други компоненти на ЕЦМ, като ламнин, хиалурон, еластин и фибронектин, също се повишават (25). Цирозата настъпва като белег на напреднала фиброза при чернодробните заболявания и черният дроб придобива нодуларна структура, съответно се променя чернодробния кръвоток и довежда до развитието на портална хипертония. Експресията на колагенови влакна може да нарастне повече от 10 пъти при цироза (191). Купферовите клетки (чернодробни макрофаги) преминават през чернодробните синусоиди и активират фиброгенезата.

### **2.1. Фиброгенеза:**

По начало фиброгенезата е динамичен процес, който се опитва да поправи всяко външно увреждане, индуцирано от агресивни фактори и който процес се характеризира със синтез на молекули на ЕЦМ- изброения по-горе набор от протеини, организирани и свързани помежду си в триизмерна мрежа. Този синтез на протеини е

компенсиран от механизмите на фибринолизата, които се стремят да унищожат този матрикс. Този органно-неспецифичен механизъм първоначално има за цел да ограничи продължаващата външна агресия- вируса на хепатит С в този случай. Все пак този процес на увреждане продължава и евентуално води до дисбаланс между фиброгенезата и фибролизата с превес на фиброгенезата и последваща акумулация на екстрацелуларен матрикс, което довежда до нарушение на чернодробната архитектура (130, 191). Обобщено, фиброгенезата първоначално е полезен процес, но става патологичен на фона на вирусното присъствие (13).

При хепатит С фиброзата започва около порталните пространства (перипортална фиброза) и се разширява към съседните пространства и централобуларните вени по пътя на септи и фиброзни мостове (87, 122, 190). Крайният стадий на фиброзата е цирозата, която се характеризира с наличието на връзки от фиброзна тъкан, които свързват повечето портални и централобуларни мезенхимни структури и изолират чернодробни клетъчни нодули.

## **2.2. Фибринолиза**

Ексцесивният ЕЦМ може да бъде премахнат чрез синтезирани от стелатните клетки матриксни металопроотеинази, които са активирани от плазмина (серинова протеаза). Въпреки това, повтарящо се чернодробно увреждане, като например от токсини или чернодробни вируси, води до превалиране на фиброгенезата над фибролизата. Като резултат нараства продукцията на ЕЦМ и намалява секрецията и активността на матриксните металопроотеинази (25, 191).

## **2.3. Фактори, повлияващи развитието на фиброзата при хепатит С:**

Тези фактори могат да бъдат свързани с вируса, с гостоприемника и дължащи се на околната среда.

Относно вирусните фактори, няколко студии първоначално предполагат асоциация между високият вирусен товар или инфекция с генотип 1 и по-агресивен ход на болестта. По-късно обаче тези данни не са потвърдени.

Факторите, свързани с гостоприемника, като възраст при заразяването и пола, изглежда са най-важни за прогресията на хепатита. По този начин инфекция в по-късна възраст изглежда е свързана с по-агресивна болест. Мъжкият пол също е свързан с лоша прогноза в повечето студии относно това. Този факт обяснява по-краткия ход на болестта, наблюдаван при млади жени. Имуният статус на организма несъмнено

повлиява естествения ход на хепатит С. Така прогресията към цироза е по-бърза при HIV-коинфектирани пациенти и при реципиенти при чернодробна трансплантация с рекурентен хепатит С (13).

По отношение на факторите на околната среда, алкохолна консумация повече от 50 гр./дневно благоприятства в по-голяма степен прогресията на фиброзата, в частност след 10-тата годишнина след инфектирането. Дори малки количества водят по-бърза прогресия на фиброзата (109, 164, 169, 171, 228). Други външни фактори, като хистологични фактори, също са свързани с по-голяма прогресия на фиброзата могат да бъдат потвърдени само след като е проведена чернодробна биопсия. Те включват некро-възпалителни лезии, стеатоза и желязно свръхнатоварване. Некро-възпалителната активност е динамичен процес, който флукутира във времето. Наличието ѝ и нейната тежест в биопсичен материал изглежда е свързан с евентуалните последици на фиброзата (16, 76, 77).

Затлъстяването и метаболитните усложнения, свързани с инсулинова резистентност, са свързани с развитието на не-алкохолен стеатохепатит, състояние, което при някои пациенти също може да прогресира до чернодробна фиброза и криптогенна цироза (42, 173, 174). Това довежда до предположението, че затлъстяването, когато е съчетано с други чернодробни болести като алкохолна чернодробна болест или хроничен хепатит С, може да има допълнителен профиброгенен ефект (50, 97, 146, 155). От друга страна, захарният диабет е главният отличителен белег на инсулиновата резистентност и рисков фактор за прогресия на фиброзата при неалкохолен стеатохепатит (19, 155). Завишената серумна глюкоза е независимо асоциирана с чернодробната фиброза при алкохолна чернодробна болест (199) и диабет с по-бърза прогресия до цироза при хроничен хепатит В (101). Л. Матева и сътр. показват взаимовръзката на стеатозата, инсулиновата резистентност и хипергликемията при хроничен хепатит С и асоциацията им с по-висока активност и напреднала чернодробна фиброза (6). Данни на К. Антонов и сътр. сочат, че наличието на чернодробна стеатоза намалява ефективността на лечението с пегилиран IFN алфа-2а и рибавирин (2).

Желязното свръхнатоварване е често срещано при пациенти с хепатит С, макар и в умерена степен. Ролята му в прогресията на фиброзата е въпрос на дебати. Изглежда е свързано с по-висока възпалителна активност или изразена алкохолна консумация (13). Резултатите от клинични студии, предполагащи, че желязното свръхнатоварване

спомага за по-бързото развитие на фиброза, са противоречиви (167). И не на последно място, при пациенти, които са претърпяли няколко биопсии, като предсказващ фактор за развитие на фиброза или цироза, е наличието на предходна фиброза, тъй като фиброзата сама по себе си може да активира фиброгенеза (158, 230).

Като допълнение към всички тези фактори е индивидуалната генетична чувствителност на организма, която може да играе важна роля относно развитието на болестта (214). Известно е, че алелите HLA DRB1\*11 и HLA-DQB1\*03 благоприятстват клирънса на вируса и са асоциирани с нисък риск от развитието на чернодробна лезия (126, 214, 217). Наличието на различни полиморфизми в гените, кодиращи имунорегулаторни протеини, цитокини или фиброгенни фактори, вероятно е важно за последствията от фиброзата както при пациенти с хроничен хепатит С, така и при алкохолна чернодробна болест или първична билиарна цироза (26).

#### **2.4.Чернодробна биопсия:**

Като най-надежден показател за степента и стадия на чернодробното увреждане се приема хистологичния материал от чернодробна тъкан, получен чрез чернодробна биопсия и оценката на степента на чернодробното увреждане според разпространението на некроинфламаторната активност и на фиброзата или наличието на цироза (78).

Биопсията също така представлява уникален източник на допълнителна информация, като например стеатоза и натрупване на желязо в черния дроб.

Чернодробната биопсия, последвана от хистологично изследване, е предпочитан метод за диагноза и оценка на фиброзата, но този метод има няколко добре обособени ограничения и противопоказания (25). В допълнение, в случаи, в които чернодробното увреждане е нехомогенно, дялът на фалшиво негативни резултати от чернодробна биопсия е 15-20%, като грешката при вземането на проби настъпва най-често, когато се анализират малки по размер биопсични материали (<10 мм) (25, 41).

Грешката при пробовземането е съществен проблем на биопсията. Проба от тъкан с тегло 10-15 мг представлява малка част от от орган, тежащ 1500 гр. Дори заболяване като хепатит С, което повлиява черния дроб относително еднородно, ще варира от лобул до лобул, въпреки че грешката е не повече от един фиброзен стадий. Грешката при пробовземането е особено показателна при малки биопсии (182).

Кървенето като усложнение от перкутанна чернодробна биопсия може да настъпи при спад на тромбоцитния брой на  $70 \times 10^9/\text{л}$  и по-малко, удължено протомбиново време  $>3$  сек над нормата или АПТТ  $>10$  сек над нормата (211).

## **2.5. Хистологична оценка на чернодробното увреждане:**

Стадият на дадена болест е мярка за това до къде е прогресирала болестта в своя естествен ход, чийто краен стадий е смъртен изход за пациента или органична недостатъчност. Степента на болестта има за цел да отрази колко бързо болестта прогресира до крайния си стадий. При повечето форми на хронична чернодробна болест крайният стадий е цироза с клинична декомпенсация, докато по-ранните стадии имат по-ниска степен на фиброза или цироза. В идеалния случай стадият и степента заедно трябва да предсказват прогнозата и да ръководят терапевтичните интервенции, въпреки че доказателствата са относително оскъдни за повечето хронични чернодробни заболявания и терапевтичните вмешательства може да променят естествения ход по начини, които не са ясно дефинирани.

Всички системи за стадиране на чернодробната фиброза са базирани на дефинирането на безусловни стадии на чернодробната фиброза, които описват нарастването на колагеновото отлагане и прогресивната деструкция на чернодробната архитектура, обхващайки промените от липса на фиброза до цироза, с променлив номер от междинни стадии (85).

### ***2.5.1. Степен на чернодробното увреждане:***

За рутинната диагностика и ръководене на пациентите се предпочита опростена система за стадиране и степенуване. Може би най-добрата е тази, предложена от група експерти, свикана от Международната Асоциация за Изучаване на черния дроб (IASL) през 1994 (54). Те препоръчват степенуване на хроничния хепатит в зависимост от степента на некро-инфламаторната активност като лека, умерена и тежка (значителна), базирайки се на корелация с Индекса на Хистологична Активност (HAI) на Knodell (111). Batts и Ludwig (28) го адаптират в една скала, състояща се от четири категории, с опростени дефиниции, основаващи се на степента на интерфейс хепатит и паренхимно увреждане и възпаление, а METAVIR-групата (30) разработват сходен алгоритъм за да достигнат до три категории (лека, умерена, тежка) точкови системи за активност. Главните особености на активността в тези системи е степента на перипортален

интерфейс хепатит („пийсмил некроза) и паренхимното увреждане (апоптоза и петниста некроза), всяка от които може да бъде степенувана. В практиката оценката на интерфейс хепатита е субективна, основани на опита на патолога (85).

#### **2.5.2. Стадий на чернодробната фиброза:**

Стадирането на хроничните хепатити изисква определяне на стадия на фиброза, което от своя страна изисква трицветно багрило Masson за точна оценка. Прогресия в стадия на болестта се наблюдава когато фиброзата напредне от липсваща до портална фиброзна експанзия, след което до бриджинг фиброза, непълна цироза и накрая до оформена цироза (85).

#### **2.6. Оценка по METAVIR:**

Предложени са комплексни цифрени системи за степенуване и стадиране на хроничен хепатит, осигуряващи по-широк обхват от стойности, с намерението тези да могат да бъдат използвани при статистически анализ на чернодробни биопсии, получени в хода на клинични проучвания. Цифровите резултати, генерирани чрез тези системи не са достатъчно възпроизводими, за да бъдат в полза при ръководенето на всеки индивидуален пациент, но те са много полезни за изследователски студии, които включват голям брой биопсии, изискващи статистически анализ.

Голям брой изследователи са показали връзка между степента на активност и прогресията на фиброзата до цироза (67, 71, 77, 230). Въпреки че, стадирането на чернодробните заболявания чрез определяне на фиброзното увреждане винаги е било главна задача при интерпретацията на чернодробната биопсия, наскоро е прието, че фиброзата е един необратим процес и че промените във времето са относително бавни, за това повечето системи за степенуване и стадиране имат относително малко стадии и съответно те са много нечувствителни за описание на промените във фиброзата (85).

Френската METAVIR група предлага изчерпателна, но сложна система за хистологична оценка на хепатит С (30). Крайният резултат отразява комбинираната оценка на лобуларната некроза, порталното възпаление, пийсмил некроза и бриджинг некроза (39). Системата METAVIR включва двата компонента по дефиниция за активност-пийсмил некроза и лобуларна некроза, но с различна равностойност. Обосновката за по-голямата тежест на пийсмил некрозата в сравнение с лобуларната

некроза е, че пийсмил некрозата е главният разграничителен фактор използван за степенуване на активността, както е показал стъпаловиден разграничителен анализ.

METAVIR системата има предимството да е опростена, възпроизводима и може да се прилага при голям брой биопсии (30). Този скор е съставен от две буквени и две цифрени кодиращи системи: A= хистологична активност и F= фиброза (таблица 1)

**Таблица 1. Системата METAVIR:**

<b>Алгоритъм за оценка на хистологичната активност:</b>		
<b>Активност A=0</b> (минимална)	<b>Лобуларна некроза = 0</b> (липсва или лека)	<b>Пийсмил некроза = 0</b> (липсва)
	<b>Лобуларна некроза = 1</b> (умерена)	
<b>A = 1</b> (лека)	<b>Лобуларна некроза = 2</b> (тежка)	<b>Пийсмил некроза = 1</b> (лека)
	<b>Лобуларна некроза = 0,1</b> (липсва или лека/ умерена)	
<b>A = 2</b> (умерена)	<b>Лобуларна некроза = 2</b> (тежка)	<b>Пийсмил некроза = 2</b> (умерена)
	<b>Лобуларна некроза = 0, 1</b> (липсва или лека/ умерена)	
	<b>Лобуларна некроза = 2</b> (тежка)	
	<b>Лобуларна некроза = 0,1,2</b> (липсва или лека/умерена/тежка)	
<b>A = 3</b> (тежка)	<b>Лобуларна некроза = 0,1,2</b> (липсва или лека/умерена/тежка)	<b>Пийсмил некроза = 3</b> (тежка)

<b>Оценка на фиброзата</b>	
<b>Точки</b>	<b>Описание</b>
<b>0</b>	<b>Липсва фиброза</b>
<b>1</b>	<b>Звездовидно разширяване на порталния тракт , но без формиране на септи</b>
<b>2</b>	<b>Разширяване на порталния тракт с редки септи</b>
<b>3</b>	<b>Формиране на множество септи</b>
<b>4</b>	<b>Цироза</b>

Докато чернодробната биопсия продължава да е в полза на диагностицирането и оценката на тежестта на чернодробните заболявания, ще има нужда от методи за показване на хистологичната информация по начини, които позволяват информацията да бъде използвана най-ефективно.

Тъй като естественият ход на различните форми на чернодробна болест и резултатите от лечението им стават все по-разбираеми, може да бъдат валидирани и включени в рутинната практика по-прости системи за степенуване и стадиране, които да се използват при ръководенето на индивидуалния пациент, в полза на клиничните резултати и терапевтичен отговор (85). Тези методи включват измерване на гликопротеини и гликани и определяне на повишения чернодробен еластичитет.

### **2.7. Еластография:**

Еластографията (FibroScan; Echosens, Paris, France) е бърза и неинвазивна техника, която измерва чернодробната плътност. На кратко, тази система е оборудвана със сонда, която се състои от ултразвуков трансдюсер, поставен на оста на вибратор. Чрез трансдюсера се предава вибрация с ниска амплитуда и честота от вибратора към тъканта. Тази вибрация индуцира еластична напречна вълна, която пропагира през тъканта. През това време се образуват пулс-отразени ултразвукови сигнали за да проследят пропагацията на напречната вълна и измерят нейната скорост, което е директно свързано с тъканната плътност (или еластичен модул). Колкото е по-твърда тъканта, толкова по-бързо пропагира напречната вълна.

### **2.8. Серумни маркери за оценка на фиброзата:**

Като изключим ограниченията на чернодробната биопсия, има неотложна нужда от разработване на неинвазивни серумни маркери, поради следните причини:

1. Има нарастващи доказателства, че дори напредналата фиброза е обратима. Показвайки това, че тежката болест е податлива на терапия, нараства и изискването за по-често изследване, отколкото е позволено за чернодробната биопсия (70).
2. Очаквано е, че ще се разработят антифиброзни терапии, което ще изисква ранно и редовно мониториране на отговора за установяване на ефективността и

оптимизиране на дозата. Както беше отбелязано, нуждата за редовно мониториране ще надхвърли възможностите на чернодробната биопсия (70).

### **2.8.1. Модели на серумни маркери, базирани на алгоритъм:**

Комбинациите от серумни маркери за фиброза, пресметнати чрез алгоритми, които дават скор за разграничаване на фиброзата, представляват нова група от тестове, отразяващи чернодробната функция, които осигуряват алтернатива на инвазивната чернодробна биопсия.

Преимуществото на алгоритъм-базираните скорови системи е, че правилно валидираният скор представлява медицина, базирана на доказателства, тъй като съчетава клиничния опит в интерпретацията на резултата. Например, един резултат може да бъде представен както следва: скор с резултат  $>0.50$  при пациент с хроничен хепатит С открива значима фиброза (стадий на фиброзата по METAVIR F2, F3 или F4) с положителна предсказваща стойност от 88%. Клиницистът може тогава да вземе решение, знаейки че шансът за грешен резултат ще бъде 12% или един на 8 пациента с хепатит С. Важно условие е, че преобладаването на значима фиброза в популацията, която се изследва и в популацията, при която се валидира позитивната предсказваща стойност на скората, е сходно.

Панелите от серумни маркери, комбинирани като скорове също така прокарват нови пътища в други области на медицината. Например, в едно проучване са идентифицирани пет серумни маркери, които комбинирани в скор, са в голяма корелация с риска от поява на инсулт (124).

Основната цел на моделите, базирани на серумни маркери, е да се замени чернодробната биопсия при колкото се може повече пациенти. Все пак се задава в съображение въпросът дали някой от серумните модели е в позицията да замени биопсията, особено имаки в предвид нейните признати ограничения.

Главните възражения срещу въвеждането на серумните модели в клиничната практика са следните: никой от моделите не е съставен от изцяло чернодробни специфични за фиброзата маркери, те също така отразяват хепатоцитната увреда или некро-инфламаторна активност, а не само измерват фиброзата (58). Също така липсват публикувани данни относно употребата на серумни модели за мониториране на отговора на терапия или тяхната възможност за мониториране на промените във фиброзния стадий във времето, въпреки че се работи по този недостатък. Друго

възражение особено относно практиката на медицинската лабораторна наука е, че публикуваните гранични стойности на серумните скорови модели, са почти сигурно повлияни от разликите в методите и/ или липсата на съгласие за стандартизация за индивидуалните маркери, използвани за пресмятане на скората (58).

Много по-сериозен проблем е, че серумните модели постигат своите най-добри резултати принципно за идентифициране на две групи от пациенти- тези с минимална или липсваща фиброза и тези с напреднала фиброза или цирроза. Все пак точността за междинната фиброза е относително слаба (34).

Накрая, въпросът с валидирането на серумните модели в различни условия на практиката, е важен, но често пренебрегван. Клиничната полза от серумните модели е критично зависима от честотата на чернодробна фиброза в популацията, която се изследва и почти всички студии са валидирали моделите си само в клиници от трети ред или болнична обстановка (182).

В практиката серумните маркери се използват в комбинации, където те достигат по-голяма възможност за успех в разграничаването на минимална от значима фиброза. Обикновено три или повече маркери се използват в комбинация чрез алгоритъм за да се произведе скор, който след това да бъде използван за предсказване на фиброза (182). В настоящият труд са използвани следните вече валидирани скорови системи за неинвазивна оценка на фиброзата и фиброгенезата:

**\* SOS FS:**

Една част от маркерите имат бърза промяна и сигнализират, че „нещо се случва”, други са по-бавно реагиращи, но променените им нива са по-добър индикатор за тежестта на фиброзните изменения.

Алфа2- макроглобулин, хаптоглобин и тромбоцитният брой са показателите, които и при трите морфологични нива от специален интерес показват сравнително добра диагностична стойност. Тези три компонента се включвани в различни формули с цел подобряване на възможностите за неинвазивно определяне на чернодробната фиброза, като желание е крайната скорова оценка да съчетава във възможно най-голяма степен леснина на изчисляване с много добра диагностична стойност. Установено е, че най-важният елемент измежду изпитваните критерии е алфа2-макроглобулинът и формулите, основани на двойна (алфа2-макроглобулин и хаптоглобин или алфа2-макроглобулин и тромбоцити) или тройна комбинация не показват съществени

различия в диагностичната си способност при проведения ROC-анализ.

След извършените множество тестувания е предложен, създаденият от Косева О. и сътр. скор (4) – SOS FS, който съчетава едновременно простота на изчислението с добра диагностична способност. SOS FS представлява разликата между серумните нива на алфа2-макроглобулин и хаптоглобин:

$$\text{SOS FS (SOfia Simplified Fibrosis Score)} = \text{алфа2-макроглобулин г/л} - \text{хаптоглобин г/л}$$

**При SOS FS  $\leq 0$**  само трима от 67 болни със значима фиброза са погрешно класифицирани към групата без септи. И тримата пациента имат фиброза F2, т.е. няколко или единични септи. Нито един от погрешно класифицираните не е имал напреднали съединително-тъканни промени. Чувствителността на теста при прагово ниво  $\leq 0$  е 95 %, отрицателната предсказваща стойност е 71 %.

Положителната предсказваща стойност също е 71 %, специфичността е ниска – 21%.

**При SOS FS  $\geq 1,6$**  само 3 от 33 болни с F0-F1 преминават този праг: специфичността на теста е 91 %, но при ниска чувствителност около 40 % (27 от 67 пациента с  $F \geq 2$ ).

Положителната и отрицателната предсказваща стойност са съответно – 90% и 58% .

Аналогично на това са определени две прагови нива за липса (**SOS FS  $\leq 0,6$** ) или наличиена напреднали фиброзни промени (**SOS FS  $> 2,0$** ).

**Фигура 2.** Опростена скала за оценка на чернодробната фиброза посредством SOS FS.

95 % чувствителност няма фиброза F ≥2	0
97 % чувствителност няма фиброза F ≥3	0.6
95% чувствителност няма цироза	1.0
“Сива зона”	1.6
91 % специфичност наличие на F ≥2	2.0
95% специфичност наличие на F ≥3	2.8
Специфичност 96% Наличие на цироза	

При прагово ниво на **SOS FS ≤ 1.0**, от 19 циротично болни може да се пропусне правилната класификация само на 1 (5 %), но близо половината от пациентите без цироза (37 от 81) са имали стойност на SOS FS по-голяма от 1,0. От тези пациенти обаче 35 имали септална съединителна-тъкан, а при 16 от тях фиброзните мостове са били множество. При SOS FS над 2,8 само 3 от 81 пациента без цироза са били фалшиво положително определени (4%), като 2 от тях имали множество септи. Но чувствителността на теста е ниска при това прагово ниво и успява да класифицира само 31 % от циротиците (4).

**\* GAMAGEN:**

О. Косева и сътр. (4), въз основа на намерените от тях корелации между биохимични показатели и алфа-ГМА (+) клетки в перипорталните зони,

определят възможностите на АСАТ, алфа2-глобулин, албумин и ИГГ да разпознаят болните със значима фиброгенеза в перипорталните/перисепталните участъци на чернодробния лобул. За значима перипортална фиброгенеза (ПФГ) е приета оценка за тази зона ≥3 т. т.е умерено и дифузно оцветяване. Перипорталните клетки с миофибробластен фенотип показват по-ниска корелация с вече отложената съединителна-тъкан в сравнение с порталните, но въз основа на наблюденията на авторите, както и тези на други автори, се счита, че перипорталната зона е определяща за бъдещите фиброзни промени. Перипорталната/перисептална фиброгенеза е ключова за нарастването на септите и свързаните с тях промени в чернодробното кръвообращение.

Въз основа на това е създадена комбинирана формула – ГАМАГЕН индекс, като се съобразява с индивидуалната разграничителната способност на всеки от маркерите, поведението им при значима ПФГ, както и с оптималните им прагови нива установени при ROC анализа. Числото, на което се дели стойността на всеки от серумните показатели, представлява неговото прагово ниво за оптимално разпознаване на ЗПФГ.

Името ГАМАГЕН индекс идва от Имуноглобулин Г, Албумин, алфа2-Макроглобулин, AST, а ГЕН от фиброгенеза.

$$\text{ГАМАГЕН индекс} = \text{IgG}/14 + \text{AST}/2\text{N} + 0,5(\text{a2MG}/2,5) - \text{albumin}/41$$

При изчисляване на ГАМАГЕН индекса концентрациите на ИгГ, албумина и алфа2-макроглобулина трябва да се представят в г/л.

При стойност на ГАМАГЕН индекса  $\geq 1,5$  чувствителността му за разпознаване на болни със значима ПФГ е 92%, а специфичността му 78 %.

Нива на ГАМАГЕН  $\geq 2,5$  показват 100% наличие на значима ПФГ, но при по-ниска чувствителност - 37%.

**При прилагане на прагови нива на ГАМАГЕН индекс  $< 0,85$  и  $> 1,5$  с висока степен на сигурност може да отхвърли или разпознае значима перипортална фиброгенеза.**

Предложения от авторите ГАМАГЕН индекс може да подпомогне разпознаването на болните, застрашени от по-бърза фиброзна прогресия. Процесите на обратно развитие на фиброзата (ако са възможни) протичат с бавна скорост и се предшества от промяна в равновесието фиброгенеза – фибролиза. Възможността по неинвазивен път да се ориентираме за протичащата фиброгенеза е в помощ на клиницистите по-бързо и динамично да оценяват прогресията на заболяването, както и ефекта от приложеното лечение (4).

\* **APRI:**

Wai и сътр. (223) създават опростен модел, състоящ се от лесно достъпни конкретни лабораторни параметри за предсказване на сигнификантна фиброза и цироза при нелекувани до този етап пациенти. За осъществяването на това използват серия от клинични и лабораторни данни от 192 СНС пациенти за формулиране на предиктивни модели, които са валидирани при 78 допълнителни пациенти.

Тъй като тромбоцитният брой и стойноститена AST са най-важните предсказващи фактори на сигнификантна фиброза и цироза, Wai и сътр. правят по-нататъшен анализ на връзката между тези два фактора и стадия на чернодробна фиброза. Авторите показват, че тежестта на чернодробната фиброза корелира сигнификантно с постепенно покачване на нивата на AST ( $r= 0.50$ ;  $p= 0.001$ ), тъй както

и със спад на тромбоцитния брой ( $r = -0.46$ ;  $p = 0.001$ ). Все пак е наблюдавано сигнификантно припокриване в стойностите на AST и тромбоцитите сред пациенти с различни стадии на фиброзата. За да засилят разликата в стойностите на AST и тромбоцитите сред пациенти с различни стадии на фиброзата, Wai и сътр. въвеждат нов индекс, представящ отношението на AST и тромбоцитите (APRI):

$$\text{APRI} = \frac{\text{АСАТ} / \text{горна граница на нормата} \times 100}{\text{Тромбоцитен брой (10.9/L)}}$$

APRI корелира сигнификантно със стадия на фиброзата, с по-висок коефициент на корелация отколкото тромбоцитите или AST сам по себе си ( $r = 0.60$ ;  $P = 0.001$ ). Базирайки се на ROC анализ, са избрани 2 гранични стойности за предсказване на липсата (координата А:  $\text{APRI} \leq 0.50$ ) или наличието (координата В:  $\text{APRI} > 1.50$ ) на сигнификантна фиброза. За пациенти с  $\text{APRI} \leq 0.50$  или по-малко, 47 от 55 (85%) не биха имали сигнификантна фиброза, само 8 (9%) биха имали  $\text{APRI} \leq 0.50$  или по-малко, 7 от които имат Ishak скор 4. За пациенти с  $\text{APRI} > 1.50$ , 37 от 42 (88%) биха имали сигнификантна фиброза и само 5 от 101 (5%) без сигнификантна фиброза биха била класифицирани неправилно. Заедно, използвайки APRI под по-ниската гранична стойност (0.50) и над по-високата гранична стойност (1.50), 51% от пациентите могат да бъдат идентифицирани коректно като такива без или със сигнификантна фиброза.

По подобен начин, 2 гранични точки са избрани за предсказване на липсата (координата С:  $\text{APRI} \leq 1$ ) или наличието (координата D:  $\text{APRI} > 2$ ) на цироза. За пациенти с  $\text{APRI} \leq 1$  или по-малко, 123 от 126 (98%) не биха имали цироза. Само 3 от 28 (11%) с цироза биха били класифицирани погрешно. От друга страна, за пациенти с  $\text{APRI} > 2$ , 16 от 28 (57%) имат цироза и само 12 от 164 (7%) без цироза биха били идентифицирани погрешно. Сред 12-те пациенти с  $\text{APRI}$  по-голям от 2.00, нямат цироза, единият имал Ishak скор 3 и петима имат Ishak скор 4. Използвайки граничните стойности между 1.00 и 2.00, липсата или наличието на цироза може да бъде идентифицирано при 81% от пациентите (223).

#### \* FIB-4:

Sterling и сътр. (204) създават модел за предсказване на чернодробната фиброза при HCV/HIV-коинфектирани пациенти, също използвайки рутинни лабораторни методи. В проучването са включени 832 пациента, при които е извършен ретроспективен анализ на чернодробната хистология. Чернодробната фиброза е

оценена чрез скоровата система на Ishak, пациентите са категоризирани като 0-1, 2-3 и 4-6 и са разпределени на случаен принцип в контролна (n=555) и валидираща (n=277) групи. Чрез мултивариабилан регресионен анализ е установено, че тромбоцитният брой (PLT), възрастта, стойностите на АСАТ и INR са асоциирани сигнификантно с фиброзата. Допълнителен анализ включва тромбоцитния брой, възрастта, АСАТ и АЛАТ като алтернативен модел. Базирайки се на връзката между 4 регресионни коефициента, произлиза следният опростен индекс- FIB-4 индекс:

$$\text{FIB-4} = \text{възраст (години)} \times \text{АСАТ (U/L)} / \text{тромбоцитен брой (10}^9\text{/L)} \times \sqrt{\text{АЛАТ (U/L)}}$$

Индексът дава стойности от 0.2 до 10. Моделът на логистична регресия с една променлива, използвайки FIB-4 като предиктивен фактор, вместо 4-те променливи от втория модел, има C-индекс 0.703 в контролната серия, което е почти идентично на втория модел. Например, при 45-годишен пациент със стойности на АСАТ 110 U/L, тромбоцитен брой  $99 \times 10^9/L$  и АЛАТ 100 U/L, FIB-4 индексът ще бъде 5. Това ще сочи 80 % възможност за напреднала фиброза (Ishak 4-6), 18 % възможност за умерена фиброза (Ishak 2-3) и само 3% възможност за лека фиброза (Ishak 0-1).

За сравнение, при 35-годишен пациент със стойности на АСАТ 75 U/L, тромбоцитен брой  $263 \times 10^9/L$  и АЛАТ 100 U/L, FIB-4 индексът ще има стойност 1.0. Това ще кореспондира с възможност за напреднала, умерена и лека фиброза съответно 12%, 45% и 43%.

FIB-4 има по-голяма площ под кривата /AUROC/ (0.737) за отдиференциране на Ishak 0-3 от тази 4-6, сравнено с неговата способност да разграничи Ishak 0-1 от 2-6 (0.711). Прилагането на FIB-4 във валидиращата група дава малко по-високи AUROC резултати за пресказване на фиброза 4-6, отколкото в контролната група (0.765) и леко по-нисък резултат за отдиференциране на Ishak 0-1 спрямо 2-6 (0.688). Следователно, базирайки се на AUROC-анализ за фиброза 0-3 и 4-6, са избрани гранични точки за предсказване също на липсата на напреднала фиброза. 90% от пациентите във валидиращата група с FIB-4 <1.45 не биха имали напреднала фиброза (отрицателна предсказваща стойност =90%) използвайки гранични стойности <1.45 и >3.25, докато тези с FIB-4 >3.25 имат специфичност 97% и позитивна предсказваща стойност от 65% за напреднала фиброза (204).

### **\*FCI**

Автори от Пакистан проучват 157 HCV инфектирани пациенти, при които е проведена чернодробна биопсия и за да отдиференцират прогресията на HCV фиброзата, определят вече налични серумни индекси AAR, APRI, FI и FIB-4. Авторите извеждат нов скор: fibrosis- cirrhosis index (FCI), състоящ се от серумните нива на АФ, билирубин, албумин и тромбоцитен брой.

$$\text{FCI} = \frac{(\text{ALP} \times \text{билирубин})}{(\text{албумин} \times \text{тромбоцити})}$$

Вече създадените серумни индекси AAR, APRI, FI и FIB-4 са сподобни да стадираят чернодробната фиброза със съответните корелационни индекси 0.130, 0.444, 0.578 и 0.494. FCI значимо корелира с хистологичните фиброзни стадии по METAVIR F0-F1, F2-F3 и F4 ( $r = 0.818$ ,  $p < 0.05$ ) с площ под ROC- кривата 0.932 и 0.996, съответно. Чувствителността и позитивната предсказваща стойност на FCI при гранична стойност  $< 0.130$  за предсказване на стадий на фиброзата F0-F1 е 81% и 82% респективно с AUROC 0.932. Съответно гранична стойност на  $\text{FCI} \geq 1.25$  за предсказване на цироза е с чувствителност и позитивна предсказваща стойност от 86% и 100%, т.е. индексът прецизно може да пресказва фиброзните стадии при пациенти с HCV инфекция (14).

### **\*GUCI**

Westin и сътр.(225) валидират нов скор, отразяващ фиброзата в DITTO студията при 269 пациента с хроничен хепатит С, участващи в III фаза на проучване, използвайки пегилиран интерферон алфа-2а и рибавирин. Авторите използват следните параметри: **(нормализиран АСАТ x PT-INR) x 100/ тромбоцитен брой (x10<sup>9</sup>)/L = GUCI** (Göteborg University Cirrhosis Index). Използван е ретроспективен анализ на изходния GUCI скор и оценка на чернодробните биопсии преди лечение, използвайки Ishak протокол. Граничните стойности на GUCI скор са пресметнати за да се разграничат пациентите с висока или ниска възможност за траен вирусологичен отговор (SVR).

Авторите наблюдават поразителна асоциация между GUCI и фиброзните стадии по Ishak (стадии 0-2 срещу стадии 3-4,  $p = 0.0002$ , стадии 3-4 срещу стадии 5-6,  $p = 0.002$ ). При пациенти с генотип 1 или 4, GUCI скор под 0.33, е асоцииран с бърз

вирусологичен отговор на антивирусно лечение и 80% честота на траен вирусологичен отговор (SVR). 92% от пациентите с SVR имат GUCI скор под 1 преди лечението.

Резултатите предполагат, че GUCI скорът по подходящ начин отразява стадия на чернодробна фиброза при HCV инфектирани пациенти и предсказва първоначалната вирусна кинетика, както и резултатите от лечението при пациенти, инфектирани с HCV генотип 1 или 4 (225).

## **2.9. Интересът към алгоритъм-базираните серумни модели:**

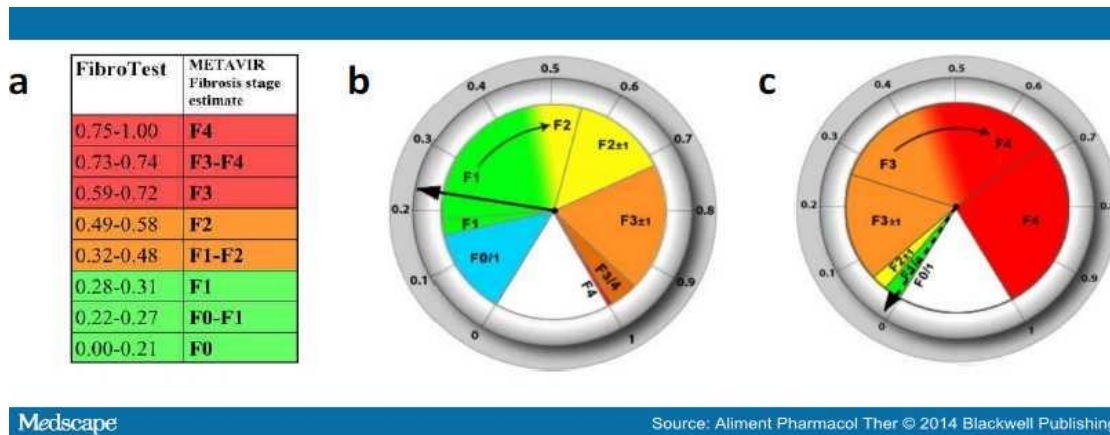
В последно време има огромен интерес в тази област, до толкова, че присъства във всеки журнал по хепатология. Въпреки това, нещото което липсва, е данни, сравняващи серумните модели помежду им. Някои от най-използваните алгоритми са:

\* **FibroTest** (102). Fibro Test използва пет серумни маркера за изчисление на скор - Апо А1, хаптоглобин, алфа-2 макроглобулин, ГГТ и билирубин, заедно с възраст и пол на пациента. В оригиналния доклад, Fibro Test скор от 0 до 0.10 осигурява 100% отрицателна предсказваща стойност за липсата на значима фиброза (дефинирана като F2, F3 или F4 по METAVIR), докато стойности от 0.60 до 1.00 имат >90% позитивна предсказваща стойност за значима фиброза при пациенти с хепатит С. Сбор от точки от 0.11 до 0.59 са неопределени и е необходима чернодробна биопсия. В независимо валидиране на Fibro Test, отрицателната предсказваща стойност на скор <0.10 е била 85% и позитивната предсказваща стойност на скор >0.60 е била 78% (183).

\***Fibrospect II** използва три серумни маркера- А2МГ, хиалуронова киселина и тъканен инхибитор на матриксните протеинази (TIMP) за изчисление на скор. Приложен при 696 пациента с хроничен хепатит С, скор <0.36 изключва значима фиброза с негативна предсказваща стойност от 76% и скор >0.36 открива значима фиброза с позитивна предсказваща стойност от 74% (160).

\***Hepascore** изисква измерването на нивата на серумния билирубин, ГГТ, А2МГ и хиалуринова киселина. Hepascore е сбор от точки от 0.00 до 1.00, пресметнати чрез резултатите от тези четири анализа, възрастта и полът на пациента. Скорът е валидиран при пациенти с хепатит С, където скор  $\geq 0.50$  осигурява 88% положителна предсказваща стойност за значима фиброза (METAVIR скор за F2 или повече) и скор <0.5 има отрицателна предсказваща стойност от 95% за липса на напреднала фиброза (METAVIR скор за F3 и повече) (12).

**\*Fibrometer-** в задълбочена студия Cales и сътр. (43) изследват общо 51 серумни маркера и са успяли да пресметнат и сравнят 5 серумни модела, вкл. Fibro Test, Fibrospect II и European Liver Fibrosis model. В допълнение те предлагат Fibrometer, нов серумен модел, който претендира да превъзхожда предходните модели. Шестте теста, които се изискват за пресмятане на Fibrometer са тромбоцитен брой, протромбинов индекс, АСАТ, А2МГ, хиалуорова киселина и урея (43).



**Фигура 3. Диагностични класификации за стадиране на фиброзата, използвани в клиничната практика за интерпретация на резултатите от кръвните тестове за оценка на фиброзата.** Тези класификации дават определен по Metavir F стадий, съответстващ на резултатите от кръвните тестове за фиброза ( **a** ) Fibrotest; ( **b** ) FibroMeter; ( **c** ) CirrhoMeter (37).

Интересът към начините за неинвазивна оценка на чернодробната болест ще продължи да нараства и през следващите години, най-вече поради причината, че болни с все по-напреднала болест ще бъдат показани за изцяло перорална терапия, която е с минимални странични действия. Тази „тежка артилерия“ пациенти в повечето случаи е контраиндицирана за чернодробна биопсия. Отделно, неинвазивната оценка на чернодробната фиброза е ценен помощник в мониторирането на антивирусната терапия и оценка на ефекта от нея. Очаква се чрез нови подходи, като протеомиката, метаболомиката и клиничната гликомика да се произведат нови биомаркери (44).

### 3. Лечение на хроничния хепатит С:

#### 3.1. „Стандарт на лечение“ – пегилиран интерферон и рибавирин:

Пегилираният интерферон алфа (peg-IFN $\alpha$ ) в комбинация с рибавирин, дозиран спрямо телесното тегло, все още е избор за лечение за България за хронична хепатит С вирусна инфекция, в частност за наивни пациенти (78). Пегилираната формула удължава полу-живота на конвенционалния IFN $\alpha$  чрез ковалентно му свързване с молекула полиетилен гликол (PEG), водейки до повишаване на цялостната честота на траен вирусологичен отговор (SVR) от < 20% на > 60%: 40% -60% при „трудните за лечение“ пациенти с генотип 1 и 4 за 48 седмици и 70%-90% при пациенти с „лесни за лечение“ генотип 2 и 3 за 24 седмично лечение (68, 76, 92, 104). За оценката на SVR, HCV RNA трябва да се измери изходно, 4-та седмица, 12-та седмица, 24 седмица, края на лечението и 12 или 24 седмици след края на лечението.

Най-често наблюдаваните странични ефекти по време на терапия с IFN/Riba са грипоподобни симптоми, отпадналост, депресия, раздразнителност, нарушения в съня, кожни реакции, диспнея и нарушения във функцията на щитовидната жлеза. От страна на хемопоезата, страничните ефекти включват неутропения, дозозависима анемия, тромбоцитопения и лимфопения (59).

### **3.2. Безинтерференови режими на терапия на хроничния хепатит С:**

Първите налични директно-действащи антивирусни агенти (DAA's) бяха HCV NS3/4A протеазните инхибитори телапревир и боцепревир. Използвани заедно с пег-интерферон за да се избегне появата на резистентност, тези лекарства подобриха резултатите от лечението, въпреки че поносимостта остана като ограничение. Няколко други DAA's бяха лансирани оттогава, включително следващата генерация NS3/4A инхибитори (като например симепревир), NS5A инхибитори на репликационния комплекс (в това число ледипасвир, даклатасвир) и нуклеоз(т)идни/не-нуклеозидни инхибитори на NS5B полимеразата (софосбувир). Тези нови DAA сега се използват самостоятелно или в комбинация с пег-интерферон и/или рибавирин, с разширяване на възможностите на безинтерференовите режими през последните години. Един от най-скорошните безинтерференови режими включва таблетка с фиксирана доза омбитасвир (NS5A инхибитор), паритапревир (NS3/4A инхибитор) и ритонавир в комбинация с дазабувир (не-нуклеоз(т)иден аналог- инхибитор на NS5B). Тази комбинация е индицирана за лечение на HCV генотип 1 инфекция (52).

#### 4. Обобщение:

Чернодробната биопсия все още е задължителна стъпка преди започване на скъпоструващо лечение според изискванията на НЗОК и според препоръките на Консенсуса за диагноза, проследяване и лечение на болни с хронични вирусни хепатити. Чернодробна биопсия не се провежда единствено при контраиндикации за това, техническа невъзможност или при доказана хистологично в миналото чернодробна цироза (3). С появата на новите терапевтични режими, болни с все по-напреднала болест подлежат на терапия. Голяма част от тях са вече с декомпенсация, изключвайки възможността за хистологична оценка. От друга страна, негативирането на вирусната RNA и постигането на траен вирусологичен отговор (SVR), не могат да дадат представа дали чернодробната болест, особено по-напредналата, е претърпяла обратно развитие. Използването на серумните биомаркери и белтъци, отразяващи некро-инфламаторната активност и фиброзния стадий на чернодробната болест, както и комплексните системи, състоящи се от комбинацията помежду им, е особено подходяща за мониториране на лечението, както и оценка на дълготрайните ефекти от него, а в случаи на невъзможност за провеждане на чернодробна биопсия-те са подходящи и за първоначална оценка на стадия на чернодробното заболяване. Те са евтини, достъпни в повечето лаборатории и удобни за клинициста и пациента, поради неинвазивния им характер

Въпреки бързото развитие на частта от хепатологията, занимаваща се с неинвазивната оценка на чернодробното увреждане, има все още нерешени въпроси в тази област. Доколко биомаркерите и неинвазивните скорове за оценка на фиброзата и фиброгенезата отразяват реално междинните стадии на фиброзата, могат ли да бъдат използвани за проследяване в динамика, как се променя индивидуално всеки маркер след лечение и най-вече - стихва ли чернодробното възпаление след лечение. Отговор на първия въпрос все още не е намерен, но вероятно с откриването на нови по-чувствителни и специфични маркери, вече ще можем по-категорично да отграничим междинната група болни според фиброзата. На останалите въпроси в голяма степен се опитваме да отговорим с настоящия дисертационен труд в помощ на по-доброто разбиране на динамиката на даден биомаркер или скорова система и каква ценна информация можем да извлечем от това.

### **III. Цел и задачи:**

#### **1. Цели:**

1. Целта настоящата работа е да се проследят промените в чернодробното възпаление, фиброзата, фиброгенезата и желязната обмяна в хода на лечение с пегилиран интерферон и рибавирин на пациенти с хроничен хепатит С
2. Да се проследят промените в чернодробната фиброза и фиброгенеза при пациенти с хепатит С, лекувани с безинтерферонов режим

За изпълнението на тези цели, поставихме следните задачи:

#### **2. Задачи:**

1. Да се оцени връзката на на показателите за възпаление (албумин, глобулини, А2МГ, хаптоглобин, hs CRP и TNF-а) със степента на активност на чернодробното заболяване и фиброзата при хроничен хепатит С
2. Да се оцени динамиката на показателите за възпаление (албумин, глобулини, А2МГ, хаптоглобин, hs CRP и TNF-а) по време на лечението с пегилиран интерферон и рибавирин при пациенти с хепатит С
3. Да се оцени връзката на показатели за обмяната на желязото (серумните нива на прохепсидин и хаптоглобин) с размножаването на вирус С и отговора на лечението с пегилиран интерферон и рибавирин.
4. Да се потърси начин за обобщено представяне на промените на тежестта на болестта по време на лечение с интерферон и рибавирин/ директно действащи антивирусни агенти при хроничен хепатит С

## IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:

### 1. Изследвани лица:

Пациентите бяха разделени в две групи, лекувани с алфа-интерферон и рибавирин през различни периоди.

В отделна група (DAA's) се обособиха малък брой (12 пациента) с HCV-инфекция, провели 12/24 седмично лечение с перорална безинтерферонова антивирусна терапия.

#### 1.1. Група А (N=98 провели лечение с IFN+Riba):

В група А бяха включени 98 болни- 40 мъже и 58 жени, лекувани с пегилиран интерферон и рибавирин през периода 2009-2011г. От тях само 4-ма бяха с генотип 3, а останалите 94 пациента- генотип 1. Чернодробна биопсия беше проведена при 97 пациента, 1 пациент беше контраиндициран за провеждане на биопсия. Дозата на рибавирин беше определена спрямо телесното тегло (1000 мг при т.т.<75 кг; 1200 мг при т.т. ≥ 75 кг). За пациенти с генотип 1, отговорящи на терапията, продължителността на лечението беше 12 месеца (48 седмици), за пациенти с генотип 3- съответно 6 месеца (24 седмици) и за пациенти, които не отговарят на лечението (NR) – от 3 до 6 месеца (12 - 24 седмици). При малка част от пациентите лечението беше прекратено преди завършване на пълния курс, поради тежки странични действия или липса на комплайънс от страна на пациента.

В група А се изследваха следните серумни показатели: ПКК, чернодробни ензими, общ белтък, албумин, IgG, алфа-2 макроглобулин, hs CRP, хаптоглобин. Всичките показатели бяха проследени изходно- преди започването на лечението, на трети месец от терапията, в края на терапията и 6 месеца след това.

Нивото на HCV RNA беше проследено изходно, на трети месец (ранен вирусологичен отговор-EVR), в края на терапията (ETR) и 6 месеца след приключването на терапията- траен вирусологичен отговор (SVR). Въз основа на това, 55 пациента постигнаха траен вирусологичен отговор (Responders) и 35 пациента- неотговорили (Null Responders)- поради липса на ранен вирусологичен отговор или релапс след края на терапията. При 8 от пациентите не можа да се определи отговора на терапията, поради преждевременно прекъсване на лечението.

## **1.2. Група В (N=40 провели лечение с IFN+Riba):**

В група В бяха включени общо 40 пациента - 24 мъже и 16 жени. При 35 от пациентите се проведе лечение с пегилиран интерферон и рибавирин. При двама от тях лечението беше прекратено на 3-ти и 6-ти месец съответно, поради тежки нежелани лекарствени реакции. 5 пациента проведоха лечение с човешки интерферон и рибавирин. Двама проведоха 6 месечен курс, а останалите трима - 3 месечен курс (поради липса на ефект). Дозата на рибавирин и при двата вида терапия беше определена спрямо телесното тегло (1000 мг при т.т.<75 кг; 1200 мг при т.т. ≥ 75 кг). По-голямата част от пациентите започнаха своето лечение през 2010 г. Последният пациент завърши курса на лечение през януари 2012. За пациенти с генотип 1, отговорящи на терапията, продължителността на лечението беше 12 месеца (48 седмици), за пациенти с генотип 2 и 3-съответно 6 месеца (24 седмици) и за пациенти, които не отговарят на лечението (NR) – от 3 до 6 месеца (12 - 24 седмици).

Рутинните лабораторни показатели- ПКК, чернодробни ензими, общ белтък, албумин, бяха проследени изходно, на трети месец от терапията, в края на терапията, като при част от пациентите, бяха проследени и 6 месеца след лечението.

Показателите прохепсидин и хаптоглобин бяха изследвани при 40 пациента. Показателят прохепсидин беше измерен изходно (преди започване на лечението), на 3-тия месец от терапията и в края на лечението, докато хаптоглобинът беше измерен изходно и на 3-тия месец. В клиничното изследване на А2МГ, hs CRP и TNFα бяха включени 32 от гореспоменатите пациенти (30 провели лечение с пегилиран интерферон и рибавирин и 2-ма, провели лечение с човешки интерферон и рибавирин). Аналогично А2МГ, hs CRP и TNFα бяха измерени изходно, на третия месец и в края на лечението (при малка част TNFα не беше измерен в края на терапията).

При всичките 40 пациенти беше извършено генотипизиране на HCV инфекцията по време на хоспитализация в Клиниката по Гастроентерология. При 33 от тях бе открит генотип 1, при 6 от тях - генотип 3 и при 1 пациент - генотип 2.

Стадият на заболяването беше определен при 33 от пациентите чрез чернодробна биопсия, извършена преди започването на специфичното антивирусно лечение. При двама пациента чернодробна биопсия не беше извършена, поради съпътстващата Хемофилия А, а при останалите 5 - поради отклонения в хемостазните показатели. Чернодробна цироза се доказа хистологично при 5 от пациентите.

Индириктни (ехографски) данни за чернодробна цироза имаше при 5 от пациентите, контраиндицирани за чернодробна биопсия.

Вирусологичния отговор беше оценен чрез измерване на HCV RNA - изходно, на 3-тия месец (ранен вирусологичен отговор /EVR/), в края на лечението (ETR) и 6 месеца след края на лечението (SVR/Relapse). Изследването беше извършено в рамките на хоспитализации в Клиниката по Гастроентерология.

При 31 пациента се установи спад на HCV RNA  $> 2 \log_{10}$  на третия месец спрямо изходните стойности (EVR), 9 пациента имаха спад на HCV RNA  $\leq 2 \log_{10}$  на третия месец спрямо изходната (NR) и общо 29 пациента имаха недоловима HCV RNA в края на лечението (ETR). Траен вирусологичен отговор постигнаха 23 пациента, а 6-ма релапсираха 6 месеца след лечението.

Въз основа на вирусологичния отговор, при интерпретацията на резултатите за прохепсидина в група В, пациентите бяха разделени на две групи: група с вирусологичен отговор в края на лечението (ETR) и група неотговорили на лечението (NRP).

Резултатите относно А2МГ, хаптоглобин, hsCRP, TNF-а, албумин, глобулини и IgG, са интерпретирани върху 129 пациента от двете групи (98-група А и 31-група В), като от група В не бяха взети под въпрос резултатите на пациентите, прекъснали преждевременно лечението или при които нямаше пълен набор резултати.

### **1.3.Група С (N=12 провели лечение с директно действащи антивирусни медикаменти):**

В групата бяха включени 12 пациента с чернодробна цироза HCV (+) Чайлд А, генотип 1b, без декомпенсация на болестта до този момент. 2-ма от пациентите имаха съпътстващ първичен чернодробен рак, за който беше проведено успешно локално лечение преди старта на терапията. 11 от болните проведоха 12 седмично лечение с Омбитазвир/ АВТ-450/ Ритонавир + Дазабувир ± Рибавирин, а 1 пациент проведе същата терапия в продължение на 24 седмици. Лечението бе проведено в периода 01.2015 – 04.2015г. Последният пациент, който проведе 24 седмично лечение, приключи терапията през 06.2015г. Поради напредналата чернодробна болест, при тази група пациенти не беше проведена чернодробна биопсия. Фиброзата и хистологичната активност бяха определени изходно, в края на лечението и 6 месеца след това чрез патентован пакет неинвазивни серологични тестове (FibroMax®). Нивото на HCV RNA беше определено изходно, на 2 седмица, на първи месец от терапията- бърз

вирусологичен отговор (RVR), в края на лечението (ETR 12/24, съответно) и 12 седмици след приключването му (SVR 12). Пациентите бяха проследявани ежемесечно по отношение на лабораторни показатели: ПКК с ДКК и рутинни биохимични изследвания (кр. захар, общ и директен билирубин, чернодробни ензими, креатинин, общ белтък и албумин, коагулационен статус), изследване на урина, както и по отношение на образни изследвания – абдоминална ехография бе проведена изходно, на първи месец, в края на лечението (12/24 седмица) и 3 и 6 месеца след края на лечението.

Показателите, включени в неинвазивните скорове за оценка на фиброзата и фиброгенезата (алфа-2 макроглобулин, хаптоглобин и имуноглобулин G, трансминази, коагулационен статус) бяха изследвани преди започване на лечение, в края на лечението и 3 и 6 месеца след края му.

Всеки пациент от изброените групи подписа информирано съгласие преди започване на проучването.

На таблица 1 са показани основните характеристики на пациентите от група А и В.

**Таблица 1. Изходна характеристика на пациентите с HCV, провели лечение с PegIFN+Ribavirin**

		Група А (n=98)	Група В (n=40)
Възраст (години)	Mean± SD	47,3±12,4	42,1± 11,9
Пол (n)	Мъже/жени	40/ 58	24/ 16
АЛТ (U/l)	Mean ± SD	93,5±49,3	89,2± 61,4
HCV RNA(IU/ml)	Mean ± SD	2 212 233 ±4 409 003	3 185 276 ±7 977 229
Хистол. активност (n) METAVIR	A0- A2	75	27
	>A2	22	6
	неизвестна	1	7
Стадий на фиброза (n) METAVIR	F0- F2	58	24
	>F2	39	9
	неизвестна	1	7

**Таблица 2.** Характеристика на HCV пациентите, лекувани с DAA's:

		<b>Група DAA's (n=12)</b>
<b>Възраст</b>	медиана	63,5
<b>Пол</b>	Мъже/ жени	5/ 7
<b>ALAT (U/l)</b>	медиана	66,5
<b>HCV RNA (IU/ml)</b>	медиана	1 119 534
<b>Активност (n) Fibromax ®</b>	A0-A2	5
	>A2	7
<b>Стадий на фиброзата (n) Fibromax ®</b>	F0-F2	3
	>F2	9

## 2. Използвани методи:

- Анамнеза и физикален статус
- Лабораторни изследвания- пълна кръвна картина, чернодробни ензими; серумни белтъци, имуноглобулини
- Абдоминална ехография- конвенционална и Доплер ехография
- Стойностите на серумния прохепсидин бяха определени чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (Hepcidin Prohormone ELISA-IBL International,Germany) с граници на чувствителност на метода 0 - 1000 ng/ml.
- Серумният хаптоглобин бе определен чрез имунотурбидиметричен анализ (Haptoglobin for COBAS INTEGRA, Roche Diagnostics) с долна граница на детекция 0,1 g/l.
- Стойностите на A2МГ в серум бяха определени чрез имунотурбидиметричен анализ (Alpha-2 macroglobulin for Cobas Mira Plus, DAKO) с обхват на метода от около 0,4 g/L до 8,8 g/L.
- Серумния hs CRP беше определен чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (hs CRP Human ELISA, Bio Vendor, Czech Republic) с долна граница на детекция 0,02 mcg/ml
- TNF-а в серум беше определен също чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (TNF-alpha ELISA Kit, Diaclone, France) с долна граница на детекция 8 pg/ml.
- За количествено измерване на HCV RNA в плазма използвахме HCV LC RT-PCR метод, пригоден за LightCycler 1.5 Roche diagn. инструмент с граница на откриване 30 IU/ml. Генотипът на вируса беше определен със същия метод.

## **2.1. Описание на методите:**

### **2.1.1. Имунотурбидиметрия:**

Имунотурбидиметрията е оптичен метод за измерване степента на мътнина. Измерва се разсеяната светлина от частици на колоиднодисперсни или грубодисперсни разтвори. Разсеяната светлина е пропорционална на броя частици, суспендирани в течна среда. При турбидиметрията се измерва намалението на интензитета на разсеяната светлина под ъгъл  $0^\circ$  спрямо посоката на възбуждащия лъч. В съвременната клинично-лабораторна практика турбидиметрията се използва най-често за изследване на антигени или хаптени-специфични индивидуални белтъци, някои лекарства и туморни маркери. Имунотурбидиметрията е директен имунометричен метод-без маркери.

Принцип: Турбидиметрията е основана на оптична отчитаща система, която измерва концентрацията на малки партикули, суспендирани в течност. Търсеният антиген в пробата се смесва със съответно антитяло, насочено срещу него. Реакцията между антигена и антитялото води до образуването на имунни комплекси и разтворът помътнява. При преминаване на светлина през разтвора мътнината разпръсва светлинния сноп и само част от него преминава. Концентрацията на търсения антиген се определя по интензитета на преминалата светлина.

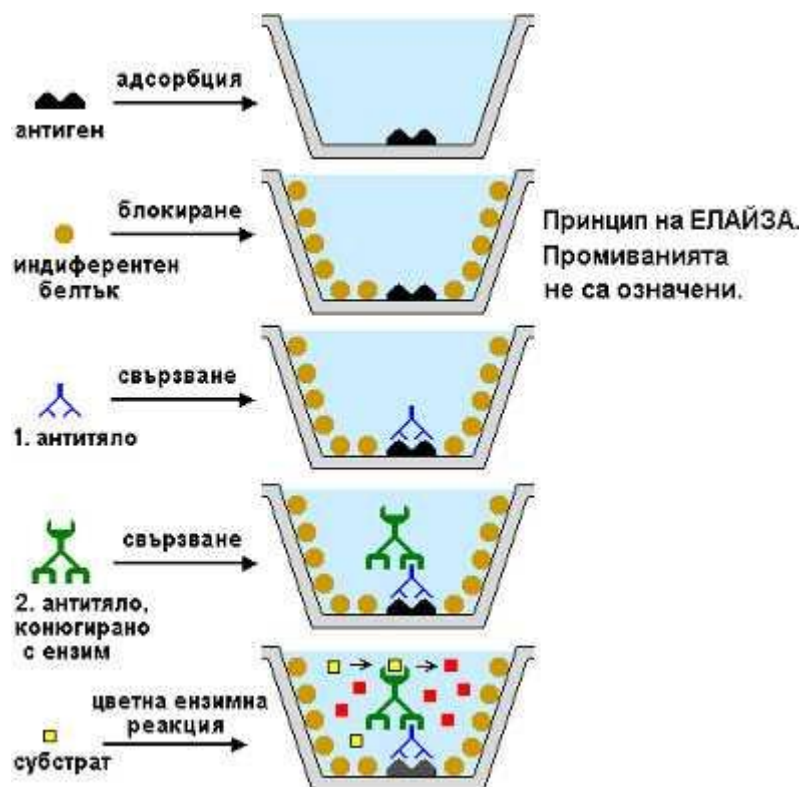
### **2.1.2. ELISA:**

При цял набор от имунологични методи реакцията антиген – антитяло се установява чрез белязани антители. Обикновено се белязва не самото антитяло, което реагира с антигена и се нарича първо антитяло, а специално получено анти-имуноглобулиново антитяло, което реагира с първото антитяло и се нарича второ антитяло. Така методът сумарно включва най-малко три етапа: (1) реакция на първото антитяло с антигена, (2) реакция на второто антитяло с първото антитяло и (3) проявяване на белега на второто антитяло.

ELISA, също като титруването се провежда в плаки с многобройни ямки, но тук дъната на ямките са плоски. Плаките са от пластмаса, върху която белтъците са склонни да се адсорбират. Първо в ямките се налива разтвор на антигена и се оставя за известно време, за да може част от него да се залепи върху дъната и стените на ямките.

След това остатъкът от антигена се изсмуква. Ямките за известно време се запълват с разтвор на някакъв индиферентен белтък, най-често говежди серумен албумин. Неговата роля е да покрие (блокира) пластмасата, за да не може никой от следващите реагенти да се адсорбира върху нея неспецифично.

Ямките отново се изпразват и в тях се нанася разтворът на първото антитяло. Дава му се време да реагира с антигена, след което се изсмуква и ямките се промиват. Слага се второто антитяло, отново се оставя да престои и се промива. Добавя се субстрат за цветна реакция, катализирана от ензима, с който е белязано второто антитяло. За разлика от имуноблота тук не е нужно цветният продукт да бъде неразтворим – ямката със същия успех може да вмести и разтворим продукт.



На различните етапи от реакцията се оставят контроли – ямки без антиген, първо антитяло или/и второ антитяло. След като цветната реакция се развие, ямките-проби се сравняват с контролите. Грубо впечатление от резултата може да се получи и на око, а точното му отчитане става с фотометър. ELISA спада към т. нар. твърдофазови имунологични методи. Общо за тях е, че в началото антигенът или антитялото се адсорбира върху някаква повърхност. После на всеки етап

реагентите, които не са се свързали специфично, могат лесно да се отмият, докато свързаните остават в комплекс върху повърхността.

### 2.1.3. Системи за неинвазивна оценка на фиброза и фиброгенеза:

Изчислихме APRI (AST to platelets ratio index) по следната формула:

**APRI= (ниво на АСАТ на болния/ стойността на горна референтна граница) x100/  
Тромбоцитен брой на болния (10<sup>9</sup>/L)**

Изчислихме Fibrosis-4 индекс-а (FIB-4) по следната формула:

**FIB-4= възраст (години) x АСАТ (U/L) / тромбоцитен брой (10<sup>9</sup>/L) x √ALAT (U/L)**

SOS FS (Sofia Simplified Fibrosis Score) изчислихме по следната формула:

**SOS FS = А2МГ г/л – хаптоглобин г/л**

GAMAGEN индексът беше изчислен по следния начин:

**GAMAGEN = ИгГ/ 14 + АСАТ/ 80 +( 0,5 x алфа-2 макроглобулин)/ 2.5 – албумин/ 41**

M-GAMAGEN индексът изчислихме по следната формула:

**Модифициран (М) GAMAGEN = общ белтък – албумин/ 31 + АСАТ/ 80 + (0,5 x алфа-2 макроглобулин)/ 2.5 – албумин/ 41**

FCI (fibrosis-cirrhosis index) изчислихме въз основа на следната формула:

**FCI = (ALP x общ билирубин) / (албумин x тромбоцити)**

GUCI (Göteborg University Cirrhosis Index) беше изчислен по следния начин:

**GUCI = (нормализиран АСАТ x INR) x 100 / тромбоцитен брой (x 10<sup>9</sup>/L)**

### 3. Статистически методи:

Използвахме следните статистически методи за оценка на достоверността на получените резултати: определяне на дескриптивни величини (средна стойност, медиана, стандартно отклонение, минимална и максимална стойност), непараметричен

тест на Kolmogorov-Smirnov за оценка на вида на разпределение на данните, параметричен Student (t-тест) за сравнение на средните аритметични на две независими групи величини, непараметричен тест на Mann-Whitney за сравнение на две независими групи величини, непараметричен тест на Kruskal-Wallis за сравнение на три и повече независими величини, Wilcoxon Signed Ranks Test и Kendall's W за непараметричен анализ на свързани величини, ANOVA, корелационен анализ за изчисляване на коефициент на линейна корелация- параметричен (Pearson) и непараметричен (Spearman).

Данните бяха обработени статистически чрез SPSS софтуер за Windows-версия 16.0.

## V. РЕЗУЛТАТИ:

### A. ИЗХОДНИ НИВА НА ПОКАЗАТЕЛИТЕ НА ВЪЗПАЛЕНИЕТО:

**Таблица 1.** Изходни стойности на показателите на възпалението в серума (група пациенти, провели лечение с PEG-IFN + Ribavirin):

Параметър	N	Средна ст. ± SD
Албумин (g/L)	n = 129	47.03±3.66
Алфа 2макроглобулин (g/L)	n = 129	3.17 ±1.01
Хаптоглобин (g/L)	n = 129	0.94 ±0.5
IgG (g/L)	n = 98	13.58 ±2.24
CRP (mg/L)	n = 129	1.67 ±2.46
TNF-alpha (pg/mL)	n = 31	78.1 ±73.1
прохепсидин (ng/ml)	n= 40	754.7 ± 295.3

#### 1. Показатели на възпалението, пол, генотип и възраст:

**Таблица 2.** Изходни разлики в стойностите на показателите на възпалението и HCV RNA според пола:

показател	пол	Брой (N)	Mean ± SD	Median	значимост (p)*
<b>A2MГ</b>	мъже	56	3.02±1.14	2.9	0.076
	жени	73	3.3±0.9	3.4	
<b>хаптоглобин</b>	мъже	56	0.98±0.51	1.02	0.526
	жени	73	0.91±0.50	0.78	
<b>hsCRP</b>	мъже	56	1.42±1.61	1.1	0.750
	жени	73	1.86±2.98	1.2	
<b>TNF-a</b>	мъже	16	82.45±78.24	70.7	0.572
	жени	15	73.41±72.25	55.7	
<b>Албумин</b>	мъже	53	47.29±3.13	47.1	0.125
	жени	71	46.83±4.02	46.3	
<b>IgG</b>	мъже	40	13.64±4.03	12.55	0.424
	жени	58	13.54±2.64	13.66	
<b>HCV RNA</b>	мъже	56	3 666 017± 6 972 943	1 661 317	<b>0.005</b>
	жени	73	1 784 342± 4 667 350	471 000	

\*Mann-Whitney test

Нямаше значима разлика между двата пола по отношение на изходните стойности на А2МГ, хаптоглобин, hsCRP, TNF-a, албумин и IgG. Статистически значима разлика между половете се доказва единствено при изходните стойности на HCV RNA в полза на мъжете ( $p=0.005$ ) (табл.2):

**Таблица 3.** Корелации на показателите на възпалението преди лечение с пола на пациентите:

пол	коефициент на корелация (r)	значимост (p)
А2МГ	0.157	0.076
hsCRP	0.028	0.752
хаптоглобин	-0.056	0.528
TNF-a	-0.105	0.575
албумин	-0.138	0.126
IgG	0.081	0.427
HCV RNA	<b>-0.247</b>	<b>0.005</b>

Единствено изходната HCV RNA беше в слаба отрицателна корелация с пола на пациентите ( $p=0.005$ ).

**Таблица 4.** Изходни разлики в стойностите на показателите на възпалението и HCV RNA според генотипа:

показател	генотип	Брой (N)	Mean $\pm$ SD	Median	значимост (p)*
А2МГ	1	119	3,27 $\pm$ 1	3,4	<b>0.000</b>
	3	10	2,06 $\pm$ 0,52	2,04	
хаптоглобин	1	119	0,92 $\pm$ 0,5	0,86	0.082
	3	10	1,2 $\pm$ 0,48	1,11	
hsCRP	1	119	1,7 $\pm$ 2,6	1,2	0.140
	3	10	1,5 $\pm$ 1,4	1,3	
TNF-a	1	25	77,64 $\pm$ 75,83	55,67	0.827
	3	6	79,89 $\pm$ 79,18	75,67	
Албумин	1	116	46,81 $\pm$ 3,6	46,75	<b>0.004</b>
	3	8	50,18 $\pm$ 3,2	49,25	
IgG	1	94	13,67 $\pm$ 3,28	13,34	0.138
	3	4	11,5 $\pm$ 1,8	11,07	
HCV RNA	1	119	2 748 839 $\pm$ 6 043 081	785 510	<b>0.055</b>
	3	10	844 212 $\pm$ 1 163 374	94 574	

\*Mann-Whitney test

Установи се значима разлика в изходните стойности на А2МГ при различните генотипове в полза на пациенти с HCV генотип 1 ( $p=0.000$ ). Пациенти с генотип 3 имаха значимо по-високи стойности на изходния албумин ( $p=0.004$ ). А пациентите с генотип 1 имаха по-висока изходна HCV RNA ( $p=0.055$ ).

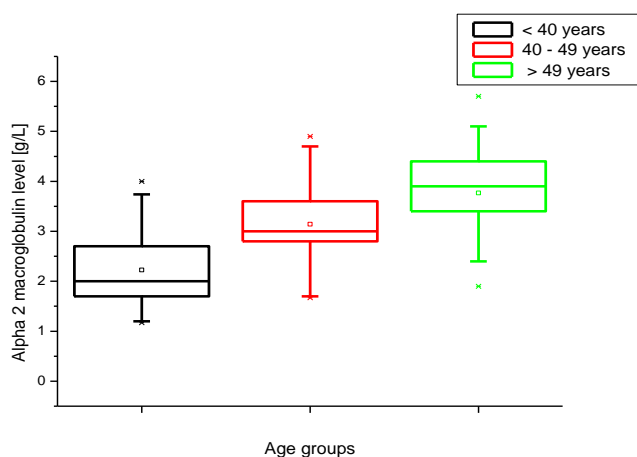
**Таблица 5.** Изходни корелации на показателите на възпалението и HCV RNA с възрастта на пациентите:

Възраст	коефициент на корелация (r)	значимост (p)
А2МГ	0.618	<b>0.000</b>
хаптоглобин	- 0.222	<b>0.011</b>
hsCRP	0.060	<b>0.498</b>
TNF-a	0.188	<b>0.311</b>
албумин	-0.440	<b>0.000</b>
IgG	0.454	<b>0.000</b>
HCV RNA	0.092	<b>0.301</b>

Възрастта на пациентите корелираше във висока степен с изходните стойности на А2МГ и умерено- със стойностите на хаптоглобин преди лечение, албумин и IgG, като албуминът и хаптоглобинът бяха в отрицателна зависимост.

### 1.1. А2МГ:

Установихме изразена позитивна корелация между изходните нива на А2МГ и възрастта на пациентите ( $r =0.618$ ;  $p =0.000$ ). Средната стойност на А2МГ при пациенти на възраст < 40 години; 40-49 години и  $\geq 50$  години бяха:  $2.23 \pm 0.72$  g/L;  $3.14 \pm 0.79$  g/L;  $3.77 \pm 0.83$  g/L, респективно. Средните стойности на А2МГ в описаните 3 групи бяха сигнификантно различни ( $p < 0.001$ ) – фигура 1.



**Фигура 1.** Разпределение на стойностите на А2МГ според възрастта на пациентите.

## 1.2. Прохепсидин:

Установи се статистически значима разлика в изходните нива на серумния прохепсидин при двата пола в полза на мъжете ( $p=0.017$ ).

**Таблица 6. Изходни стойности на прохепсидин според пола:**

	Брой (N)	Mean $\pm$ SD	Median
Мъже	24	874,48 $\pm$ 158,23	980,55
Жени	16	575,07 $\pm$ 361,91	665,2

Не се намери разлика в нивата на прохепсидина между различните HCV генотипове.

**Таблица 7. Изходни стойности на прохепсидин според генотипа:**

Показател	генотип	Брой (N)	Mean $\pm$ SD	Median	значимост (p)
прохепсидин	1	33	767,44 $\pm$ 294,01	910,75	0.524
	2 и 3	7	694,71 $\pm$ 317,40	740,90	

Корелация между изходните нива на прохепсидина и възрастта на пациентите не бе установена.

**Таблица 8. Зависимост между изходните стойности на прохепсидин и възрастта на пациентите.**

параметър	възраст	коэф. на корелация (r)	значимост (p)
прохепсидин	N=40	-0.075	0.645

В допълнение, общо за цялата група пациенти (група В) се доказва **статистически значима положителна корелация между изходните нива на HCV RNA и прохепсидина (Spearman=0.475;  $p=0.002$ ).**

## 1.3. Хаптоглобин, TNF- $\alpha$ , hsCRP, албумин, IgG, HCV RNA:

На таблицата по-долу е показано разпределението на стойностите на A2MG и хаптоглобин при различните възрастови групи.

**Таблица 9. Изходни стойности на A2MG и хаптоглобин според възрастта на пациентите:**

Възрастова група	Показател	Mean± SD	Median
< 40 г.	A2МГ	2,23± 0,72	2,0
	Хаптоглобин	1,13± 0,45	1,11
40-49 г.	A2МГ	3,14± 0,79	3,0
	Хаптоглобин	0,82± 0,47	0,75
> 50 г.	A2МГ	3,77± 0,83	3,9
	Хаптоглобин	0,87± 0,52	0,78

Въпреки разликите в стойностите на A2МГ при различните възрасти ( $p < 0.001$ ), нямаше значима разлика в различните възрастови групи по отношение на стойностите на хаптоглобина ( $p=0.166$ ).

**Таблица 10.** Изходни стойности на hsCRP, TNF-а, албумин, IgG и HCV RNA според възрастта на пациентите:

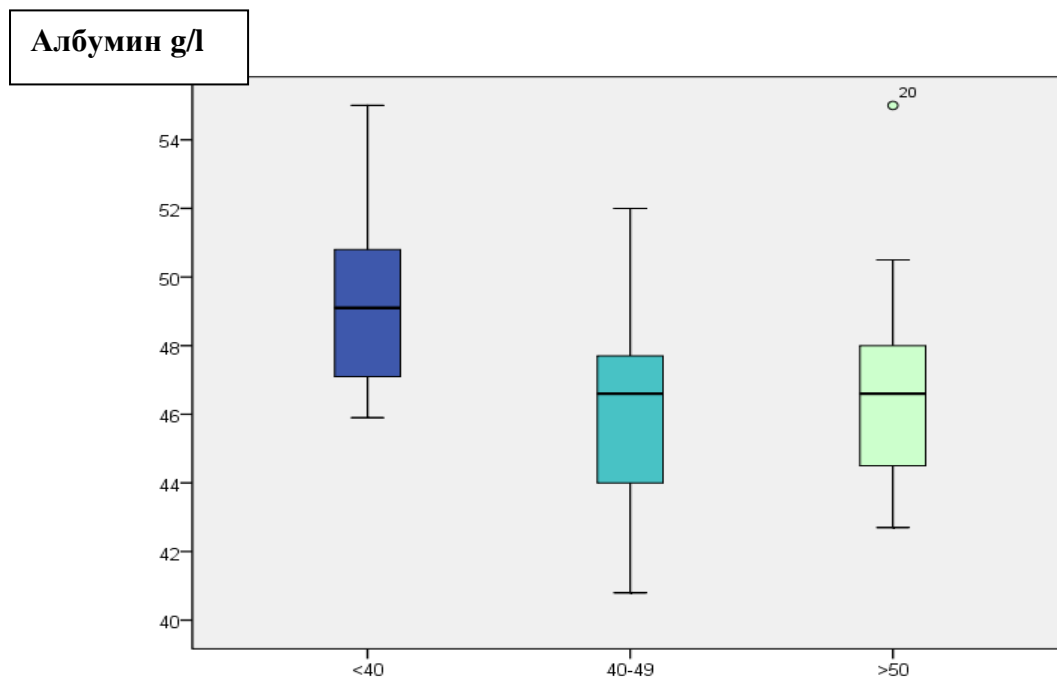
Възрастова група	Показател	Mean± SD	Median	Значимост (p)*
< 40 г.	hsCRP	1.16±1.41	0.60	hsCRP: 0.172
	TNF-а	59.55±57.64	32.3	
	Албумин	49.1±2.4	49	
	IgG	11.3±1.57	11.58	
	HCV RNA	1 745 448±2 544 496	587 231	
40-49 г.	hsCRP	0.97±1.48	0.03	Албумин: <b>0.001</b>
	TNF-а	78±86.1	49	
	Албумин	46.8±5.43	46	
	IgG	13.51±2.67	13.80	
	HCV RNA	2 381 961±5 343 565	985 607	
> 50 г.	hsCRP	1.24±2.81	0.58	IgG: 0.122
	TNF-а	102.2±84.04	104	
	Албумин	46±2.47	46.1	HCV RNA: 0.115
	IgG	14.69±3.54	14.28	
	HCV RNA	3 231 665±7 317 043	777 866	

\*Kendall's W Test

Нямаше значими разлики в изходните стойности на hsCRP, TNF- $\alpha$ , IgG и HCV RNA в различните възрастови групи.

Установи се сигнификантна разлика в изходните стойности на албумина в различните възрастови групи, като при пациенти <40г. възраст, той е значимо по-висок ( $p=0.001$ ).

**Фигура 2.** Разлики в изходните стойности на албумина при различните възрастови групи:



## 2. Показатели на възпалението и хематологични показатели:

**Таблица 11.** Значими изходни корелации на хемоглобина и тромбоцитите с показателите на възпалението:

Изходно N= 129	hsCRP	прохепсидин N= 40	Изходно N= 129	A2MГ	hsCRP	хаптоглобин
хемоглобин	$r = -0.174$ $p = 0.048$	$r = 0.364$ ; $p = 0.021$	тромбоцити	$r = -0.201$ ; $p = 0.022$	$r = 0.198$ ; $p = 0.024$	$r = 0.439$ ; $p = 0.000$

Изходно хемоглобинът корелираше в умерена степен единствено с изходните нива на прохепсидина, а изходните тромбоцити корелираха положително в умерена степен с хаптоглобина.

## 3. Показатели на възпалението и хистологична активност и фиброза:

**Таблица 13.** Изходни корелации на хистологичната активност и фиброза с възрастта на пациентите:

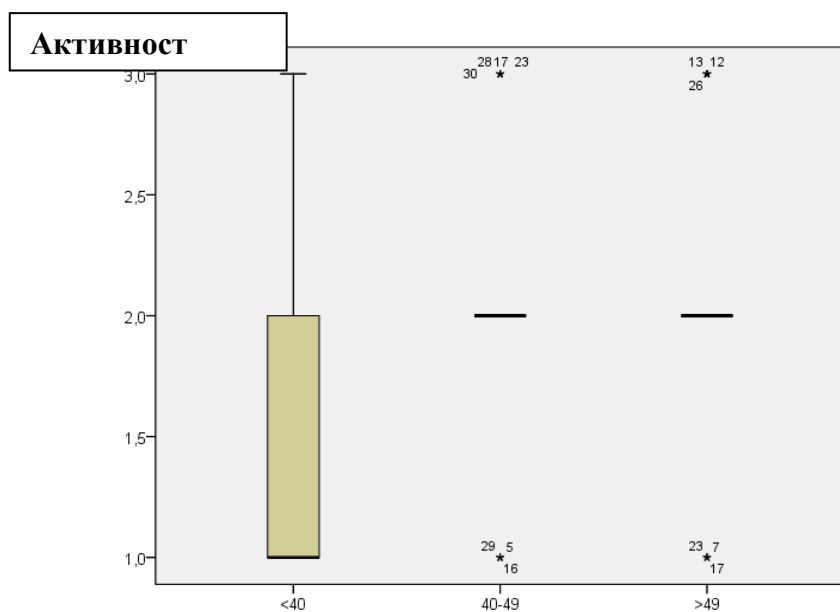
<b>Възраст</b>	коэффициент на корелация (r)	значимост (p)
<b>хистологична активност</b>	<b>0.368</b>	0.000
<b>фиброза</b>	0.248	0.005

**Таблица 14.** Изходни стойности на хистологична активност и фиброза според възрастта на пациентите

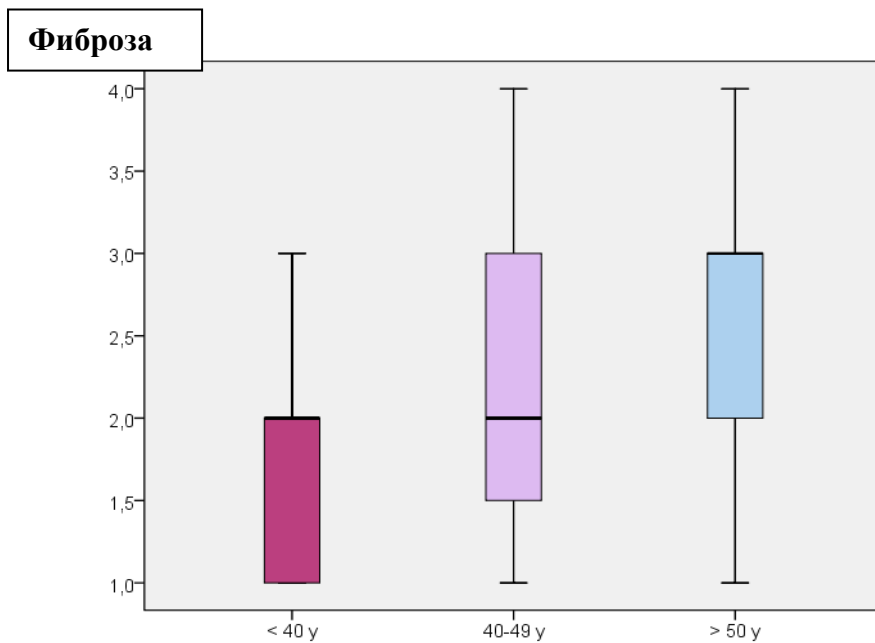
Възрастова група	Показател	Mean± SD	Median
<b>&lt; 40 г.</b>	<b>Хистологична активност</b>	1,60± 0,74	1,0
	<b>фиброза</b>	1,86± 0,73	2,0
<b>40-49 г.</b>	<b>Хистологична активност</b>	2,07± 0,58	2,0
	<b>фиброза</b>	2,17± 0,87	2,0
<b>&gt; 50 г.</b>	<b>Хистологична активност</b>	2,18± 0,60	2,0
	<b>фиброза</b>	2,40± 0,85	2,50

Отделните възрастови групи се различаваха значимо и по степента на хистологична активност ( $p=0.003$ ) и стадий на фиброза ( $p=0.013$ ), като възрастовите групи 40-49 години и >50 г. имаха по-висока хистологична активност и по-напреднала фиброза (фигура 4 и 5).

Фигура 3. Разлики в степените на активност при различните възрастови групи:

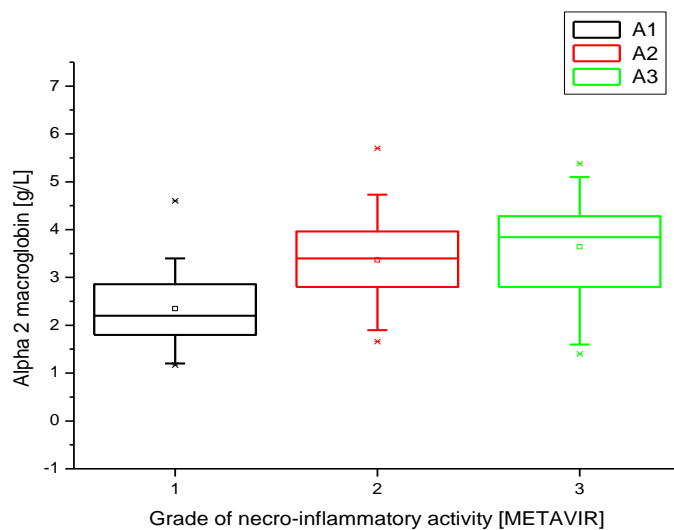


Фигура 4. Разлики в стадияте на фиброзата при различните възрастови групи:

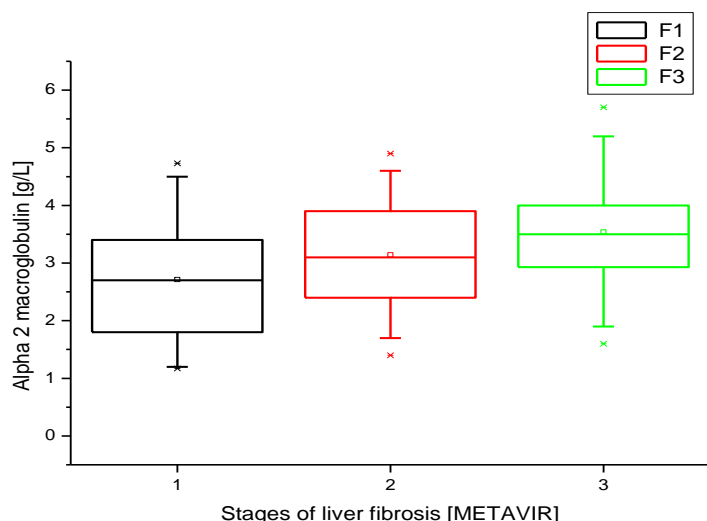


### 3.1. A2МГ:

фигура 5а - Изходни нива на А2МГ според степента на некро-инфламаторната активност (METAVIR):



Фигура 5b – Изходни нива на А2МГ според стадия на чернодробната фиброза (METAVIR):



Средната стойност на A2MG преди лечението сред пациентите със степен на некро-инфламаторна активност A1, A2 и A3 на чернодробната болест са  $2.34 \pm 0.79$  g/L;  $3.36 \pm 0.90$  g/L и  $3.64 \pm 1.01$  g/L, съответно. Средното ниво на A2MG беше сигнификантно по-ниско при пациенти с A1 спрямо A2 ( $p < 0.001$ ) и A3 ( $p < 0.001$ ) – фигура а.

Средните нива на A2MG преди лечението при пациенти със стадий на чернодробната фиброза F1, F2 и F3 са  $2.71 \pm 1.05$  g/L;  $3.14 \pm 0.94$  g/L и  $3.53 \pm 0.96$  g/L, съответно. Пациенти с F3 стадий на фиброзата бяха с най-високи средни нива на A2MG, в сравнение с тези с F1 ( $p < 0.001$ ) и F2 ( $p < 0.05$ ) – фигура б.

### 3.2. Прохепсидин:

Намаше връзка и между степента на хистологичната активност, стадия на фиброза и нивата на прохепсидина.

**Таблица 15. Зависимости между стойностите на прохепсидин с хистологичната активност и стадия на фиброза (N=33).**

METAVIR	Хистологична активност	Фиброза
прохепсидин изходно	$p = 0.630$	$p = 0.780$

**Таблица 16. Изходен прохепсидин според хистологичната активност и фиброзата:**

METAVIR	N=	mean±SD	median	значимост (p)*
A1	17	799±276	980	0.832
A2	10	684±352	795	
A3	10	722±312	726	
F1	14	680±349	755	0.539
F2	10	863±247	981	
F3	13	730±284	691	

\*Kendall's W Test

Нямаше разлика в стойностите на прохепсидина при различните степени на активност и стадии на фиброза преди лечението.

### 3.3. Хаптоглобин, TNF-a, hsCRP, албумин, IgG, HCV RNA:

**Таблица 17.** Изходни корелации на показателите на възпалението и HCV RNA с хистологичната активност и фиброзата:

	коефициент на корелация (r)	значимост (p)	коефициент на корелация (r)	значимост (p)
	<b>активност</b>		<b>фиброза</b>	
A2МГ	<b>0.437</b>	<b>0.000</b>	<b>0.310</b>	<b>0.000</b>
хаптоглобин	<b>-0.199</b>	<b>0.026</b>	0.046	0.607
hsCRP	-0.100	0.269	-0.006	0.946
TNF-a	0.245	0.209	-0.134	0.497
албумин	<b>-0.360</b>	<b>0.000</b>	<b>-0.227</b>	<b>0.013</b>
IgG	<b>0.215</b>	<b>0.035</b>	<b>0.212*</b>	<b>0.037*</b>
HCV RNA	0.089	0.323	0.095	0.290

\*Pearson Correlation

В най-висока степен се наблюдаваше положителна зависимост между A2МГ и хистологичната активност ( $r=0.437$ ) и фиброзата ( $r=0.310$ ) и отрицателна зависимост между изходния албумин и хистологичната активност ( $r= -0.360$ ) и стадия на фиброзата ( $r= -0.227$ ). В по-малка степен, но също значимо корелираше с хистологията и изходния IgG ( $p=0.035$ ;  $p=0.037$ ). Хаптоглобинът преди лечение беше в обратна зависимост с степента на хистологична активност ( $p=0.026$ ). Изходните hsCRP, TNF-a и HCV RNA не показаха връзка с активността и фиброзата.

**Таблица 18.** Изходни стойности на показателите на възпалението и HCV RNA според хистологичната активност:

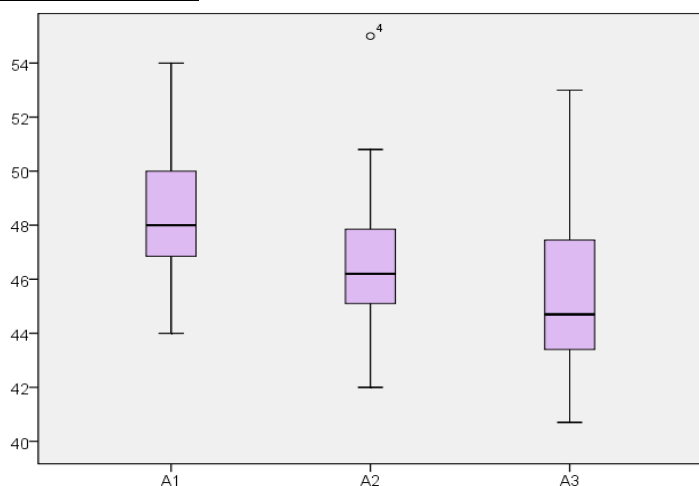
Активност METAVIR	Показател	Mean± SD	Median	Значимост (p)*
A1	хаптоглобин	1±0.45	0.99	hsCRP: 0.256
	hsCRP	1.13±1.4	0.87	
	TNF-a	52.12±57.80	29.0	
	Албумин	48.5±2.53	48	TNF-a: 0.717
	IgG	12.0±1.96	12.0	
	HCV RNA	3 868 658±9 066 131	482 085	
A2	хаптоглобин	0.96±0.54	0.88	Албумин: <b>0.002</b>
	hsCRP	1.30±2.77	0.55	
	TNF-a	102±86.1	139.0	
	Албумин	47.1±4.02	46.6	Хаптоглобин: 0.174
	IgG	13.7±3.18	13.5	
	HCV RNA	1 845 967±4 064 050	750 792	IgG: 0.103
A3	хаптоглобин	0.73±0.44	0.62	HCV RNA: 0.507
	hsCRP	0.74±0.98	0.23	
	TNF-a	108.2±90.5	82.3	
	Албумин	45.4±3.2	44.7	
	IgG	14.6±3.7	13.9	
	HCV RNA	2 930 463±5 427 381	693 933	

**\*Kendall's W Test**

Единствено при изходните стойности на серумния албумин се доказа значима разлика в зависимост от хистологичната активност, т.е. пациенти, които имаха по-ниска степен на активност на чернодробната болест (A1) имаха по-високи средни стойности на албумина (p=0.002) (фигура 6)

**Фигура 6.** Разлики в изходните стойности на серумния албумин в зависимост от активността на чернодробната болест:

**Албумин g/l**



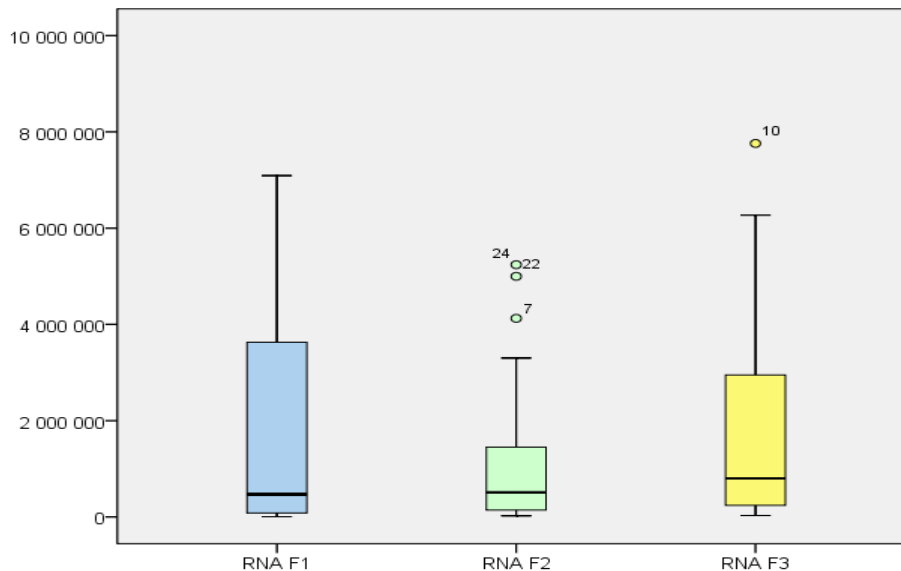
**Таблица 19.** Изходни стойности на показателите на възпалението и HCV RNA според стадия на фиброзата:

Фиброза METAVIR	Показател	Mean± SD	Median	Значимост (p)*
F1	хаптоглобин	0.84±0.45	0.77	hsCRP: 0.938
	hsCRP	0.89±1.09	0.50	
	TNF-a	94.1±65.6	95.6	Хаптоглобин: 0.871
	Албумин	48.1±3.1	47.6	
	IgG	12.7±3.1	13	
	HCV RNA	4 767 227±10 468 574	471 000	Албумин: 0.556
F2	хаптоглобин	1.0±0.47	0.97	IgG: 0.526
	hsCRP	1.32±3.07	0.40	
	TNF-a	52±77.1	14.0	
	Албумин	47.3±4.6	47	
	IgG	13.3±2.8	12.8	
	HCV RNA	1 419 807±1 789 534	565 787	
F3	хаптоглобин	0.87±0.56	0.75	HCV RNA: <b>0.043</b>
	hsCRP	1.10±1.56	0.58	
	TNF-a	81.4±91.2	65.7	
	Албумин	46±2.7	46.2	
	IgG	14.5±3.6	13.9	
	HCV RNA	2 381 908±4 330 924	777 866	

\*Kendall's W Test

Нямаше разлики в изходните стойности на hsCRP, хаптоглобина, TNF-а, албумина и IgG при различните стадии на фиброза. Единствено при стойностите на HCV RNA имаше значима разлика при различните стадии на фиброза ( $p=0.043$ )-пациентите с по-начална фиброза имаха значимо по-висока изходна HCV RNA (фигура 7)

**Фигура 7.** Разлики в изходната HCV RNA при различните стадии на фиброза:



#### 4. Скорове-изходни стойности, връзки помежду им и с показателите на възпалението:

Чернодробната фиброза е статичен процес, за чието обратно развитие е необходимо много време. Тя е резултат от един динамичен процес на отлагане на екстрацелуларен матрикс в перипорталните пространства. За сега в литературата има доказан единствен маркер за неинвазивна оценка перипорталната фиброгенеза, който е създаденият от О. Косева и сътр. GAMAGEN индекс (4). Той е изключително полезен за разграничаване на активна от неактивна фиброза. Авторите са предложили следната формула за изчислението му:

$$GAMAGEN = \frac{IgG}{14} + \frac{AST}{2N} + 0.5 \left( \frac{A2MG}{2.5} \right) - \frac{албумин}{41}$$

##### 4.1. Модифициране на класическия GAMAGEN индекс:

С цел опростяване на начина на пресмятане на индекса, модифицирахме формулата, като заменихме IgG с по-прости и рутинни за изследване лабораторни параметри-разликата между общ белтък и албумин, т.нар. глобулини, разделени на нормалните им стойности в серума. В резултат се получихме следната формула на модифицирания GAMAGEN:

$$M-GAMAGEN = \frac{общ\ белтък - албумин}{31} + \frac{AST}{2N} + 0.5 \left( \frac{A2MG}{2.5} \right) - \frac{албумин}{41}$$

За да се уверим, че двата показателя са взаимнозаменяеми, изчислихме корелационната зависимост между двата сора преди лечение и установихме изключително висока корелация:

**Таблица 20.** Корелация GAMAGEN – M GAMAGEN преди лечение:

	<b>M-GAMAGEN</b>
<b>GAMAGEN</b>	<b>r= 0.974 p= 0.000 N= 98</b>

На следващата таблица са показани изходните стойности на скоровите системи за неинвазивна оценка на фиброзата и фиброгенезата, които ние използвахме.

**Таблица 21.** Изходни стойности на скорове при пациентите, провели лечение с PEG-IFN + Ribavirin:

	<b>N=</b>	<b>mean ± SD</b>	<b>median</b>
<b>GAMAGEN</b>	98	1,28 ± 0,67	1,21
<b>M-GAMAGEN</b>	129	1,23 ± 0,77	1,13
<b>APRI</b>	129	0,87 ± 0,71	0,61
<b>FIB-4</b>	129	1,56 ± 1,21	1,22
<b>SOS FS</b>	126	2,22 ± 1,26	2,25

За да оценим взаимовръзката между стандартния индекс GAMAGEN и неговата модификация, определихме техните корелационни зависимости с изходните показатели на възпалението и останалите индекси преди лечение. Установихме силно изразени зависимости с албумина, глобулините, алфа-2 макроглобулина, APRI, FIB-4 и SOS FS и при двата сора. Също така и при двата индекса имаше умерено изразени зависимости с хаптоглобина (отрицателна), хистологичната активност и фиброзата. M-GAMAGEN корелираше умерено с изходните стойности на TNF-а. Нямаше връзка между двата сора и hsCRP, прохепсидин и изходната виремия.

**Таблица 22.** Изходни корелации на GAMAGEN и M-GAMAGEN с показателите на възпалението, хистологията и виремията.

Исходен показател	GAMAGEN	M-GAMAGEN
АЛБУМИН	r= -0.472; p= 0.000; N= 98	r= -0.592; p= 0.000 N= 124
ГЛОБУЛИНИ	r= 0.550; p= 0.000; N= 98	r= 0.666 p= 0.000 N= 129
IgG	r= 0.692; p= 0.000; N= 98	
АЛФА-2 МАКРОГЛОБ.	r= 0.681; p= 0.000; N= 98	r= 0.611 p= 0.000 N= 129
ХАПТОГЛОБИН	r= -0.334; p= 0.001; N= 98	r= -0.248 p= 0.005 N= 129
hsCRP	r= -0.023; p= 0.824; N= 98	r= -0.039 p= 0.662 N= 129
TNF-a		r= 0.409 p= 0.022 N= 31
ПРОХЕПСИДИН		r= 0.253 p= 0.169 N= 31
ХИСТОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ	r= 0.322; p= 0.001; N= 97	r= 0.324 p= 0.000 N= 125
ФИБРОЗА	r= 0.242; p= 0.017; N= 97	r= 0.309 p= 0.000 N= 125
APRI	r= 0.766; p= 0.000; N= 98	r= 0.699 p= 0.000 N= 129
FIB-4	r= 0.718; p= 0.000; N= 98	r= 0.610 p= 0.000 N= 129
SOS FS	r= 0.678; p= 0.000; N= 95	r= 0.579 p= 0.000 N= 125
HCV RNA	r= -0.132; p= 0.194; N= 98	r= -0.058 p= 0.513 N= 129

**4.2. Скорови системи при пациентите, провели лечение с директно действащи антивирусни медикаменти (група С):**

**Таблица 23.** Медиани на различните скорове изходно при пациентите, провели лечение с DAA's:

N=12	median
GAMAGEN	2.13
M-GAMAGEN	1.74
GUCI	1.21
FCI	0.25
APRI	1.17
FIB-4	3.33
SOS FS	4.03

**5. Изходни корелационни връзки между биохимични, хематологични и морфологични показатели:**

**Таблица 24.** Зависимости между изходните стойности на показателите на възпалението ( $r > 0.300$ ):

	Албумин	Глобулини*	IgG	A2m	Хаптоглобин
Албумин		<i>r= -0.608</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 124</i>	<i>-0.347</i> <i>0.000</i> <i>N=98</i>		
Глобулини			<i>r=0.742</i> <i>p=0.000</i> <i>N=98</i>		
IgG				<i>r= 0,375</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 98</i>	
A2m			<i>r= 0,375</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 98</i>		
CRP					<i>r=0.316</i> <i>p=0.000</i> <i>N=129</i>
хаптоглобин				<i>r= -0,325</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 129</i>	

\*Глобулини= общ белтък – албумин

В групата пациенти, провели лечение с IFN+рибавирин, се установи силна положителна корелация на A2MГ с глобулините и IgG и отрицателна-с албумин и хаптоглобин. Очаквано при тези пациенти имаше силна зависимост между албумин, глобулини и IgG, като части от протеиновата фракция в кръвта. Между хаптоглобина и CRP също имаше значима положителна корелация.

Не се установиха статистически значими зависимости на TNF- $\alpha$  и прохепсидин с останалите показатели на възпалението.

На таблица 25 са показани основните връзки на изходните показатели на възпалението със степента на хистологична активност, стадия на фиброзата и някои рутинни лабораторни параметри (АСАТ, АЛАТ и тромбоцити).

**Таблица 25. Зависимости между изходните стойности показателите на възпалението с активността, фиброзата и рутинни лабораторни параметри ( $r>0.300$ ):**

Параметър	Албумин	Глобулини	IgG	A2m	Хаптоглобин
Хистологична активност				<i>r= 0,433</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 125</i>	
Фиброза				<i>r= 0,325</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 125</i>	
АСАТ			<i>r= 0.327</i> <i>p= 0.001</i> <i>N= 98</i>	<i>r= 0,437</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 129</i>	<i>r= -0.303</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 129</i>
Тромбоцити					<i>r= 0.434</i> <i>p= 0.000</i> <i>N= 129</i>

Беше наблюдавана изразена корелация на А2МГ ( $r=0.433$ ) и албумина ( $r= -0.281$ ) със степента на хистологична активност, в по-малка степен, но също значима беше корелацията на IgG ( $r= 0.242$ ) и хаптоглобин ( $r= -0.185$ ) с хистологичната активност. Стадият на чернодробна фиброза корелираше в най-голяма степен отново с А2МГ ( $r= 0.325$ ), по-слабо-с албумин ( $r= -0.207$ ) и IgG ( $r=0.212$ ). Цитолитичните ензими, в частност АСАТ, показаха значима положителна корелация с А2МГ ( $r= 0.437$ ) и отрицателна-с хаптоглобин ( $r= -0.303$ ), а тромбоцитите- значима отрицателна зависимост с А2МГ ( $r= -0.201$ ) и положителна-с хаптоглобин ( $r= 0.434$ ), които са още едно потвърждение на ключовата роля на А2МГ и хаптоглобина в патогенезата на чернодробното увреждане, в частност- с хепатит С-вирусна етиология. Нямаше зависимост между hsCRP, TNF- $\alpha$ , прохепсидин и посочените показатели.

**Таблица 26. Зависимости между изходните показатели на възпалението, скоростите системи и възрастта на пациентите (само значими):**

Параметър	Албумин	Глобулини	IgG	A2m	CRP	TNF-a	Хаптоглобин	прохепсидин
APRI			$r= 0.301$ $p= 0.003$ $N= 98$	$r= 0,434$ $p= 0.000$ $N= 129$			$r= -0.397$ $p= 0.000$ $N= 129$	
FIB4			$r= 0.382$ $p= 0.000$ $N= 98$	$r= 0,532$ $p= 0.000$ $N= 129$			$r= -0.387$ $p= 0.000$ $N= 129$	
SOS FS			$r= 0.377$ $p= 0.000$ $N= 95$	$r= 0,925$ $p= 0.000$ $N= 126$		$r= 0.352$ $p= 0.052$ $N= 31$	$r= -0.641$ $p= 0.000$ $N= 126$	
HCV RNA								$r= 0.444$ $p= 0.012$ $N= 31$
age	$r= -0.359$ $p=0.000$ $N=129$		$r= 0,461$ $p= 0.000$ $N= 129$	$r= 0,618$ $p= 0.000$ $N= 129$			$r= -0.224$ $p= 0.011$ $N= 129$	

По отношение на скоростите за неинвазивна оценка на фиброзата APRI, FIB-4 и SOS FS, отново в най-голяма степен корелираха със стойностите на А2МГ и хаптоглобина ( $p= 0.000$ ), така също и с IgG. В по-малка степен, но също значимо, скоростите корелираха с нивата на албумина и глобулините. При SOS FS се установи значима положителна корелация с TNF-а ( $p= 0.052$ ). Стойностите на HCV RNA в група В единствено корелираха с нивата на прохепсидин ( $p= 0.012$ ). Възрастта на пациентите корелираше в много голяма степен със стойностите на IgG и А2МГ (положителна) и по-слабо с албумина и хаптоглобина (отрицателна).

**Връзка между скоровите системи:**

**Таблица 27.** Връзка между изходните стойности на различните скорове, хистологичната активност и фиброзата:

	HCV RNA	SOS FS	APRI	FIB-4	A	F
SOS FS	$r=0.034; p=0.709$		$r=0.499$ $p=0.000$ $N=126$	$r=0.590$ $p=0.000$ $N=126$	$r=0.433$ $p=0.000$ $N=122$	$r=0.260$ $p=0.004$ $N=122$
APRI	$r=0.040; p=0.654$			$r=0.868$ $p=0.000$ $N=129$	$r=0.303$ $p=0.001$ $N=125$	$r=0.271$ $p=0.002$ $N=125$
FIB-4	$r=0.126; p=0.156$				$r=0.330$ $p=0.000$ $N=125$	$r=0.262$ $p=0.003$ $N=125$

Значимо корелираха помежду си APRI, FIB-4 и SOS FS. И трите индекса корелираха значимо със степента на хистологична активност и доста по-слабо- с чернодробната фиброза. Нямаше зависимост между изходната виремия и стойностите на скоровите системи преди лечение.

**Зависимости между скоровите системи при пациенти, лекувани с DAA's:**

При пациентите, провели лечение с директно действащи антивирусни медикаменти, се установиха изключително високи корелационни зависимости на двата сора за оценка на фиброгенезата. Изходният GAMAGEN отново корелираше в най-висока степен с модифицирания скор, след което с GUCI и APRI. M-GAMAGEN корелираше силно с изходните FCI и APRI, GUCI беше в силна зависимост с изходните FCI, APRI и FIB-4. FCI корелираше значимо с APRI и FIB-4, както и те помежду си.

**Таблица 28.** Изходни корелации между скоровете при пациенти, провели безинтерферонова терапия (само значими):

Корелация	изходно
GAMAGEN – M GAMAGEN	$r=0.982; p=0.000$
GAMAGEN – GUCI	$r=0.769; p=0.003$
GAMAGEN – APRI	$r=0.727; p=0.007$
M GAMAGEN – GUCI	$r=0.864; p=0.001$
M GAMAGEN – FCI	$r=0.673; p=0.023$
M GAMAGEN – APRI	$r=0.818; p=0.002$
GUCI – FCI	$r=0.916; p=0.000$
GUCI – APRI	$r=0.986; p=0.000$
GUCI – FIB-4	$r=0.860; p=0.000$
FCI – APRI	$r=0.902; p=0.000$
FCI – FIB-4	$r=0.853; p=0.000$
APRI – FIB-4	$r=0.874; p=0.000$

## **В. ПРОМЯНА НА ПОКАЗАТЕЛИТЕ НА ВЪЗПАЛЕНИЕТО ПРИ ЕФЕКТИВНО И НЕЕФЕКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ:**

### **1. Вирусологичен отговор:**

От всичките 129 пациента, провели лечение с интерферон и рибавирин, 115 постигнаха спад на HCV RNA > 2 log10, т.е. ранен вирусологичен отговор (EVR); отговор в края на лечението (ETR) имаше при 90 пациента, а траен вирусологичен отговор- неоткриваема HCV RNA 6 месеца след лечение (SVR) имаше при 57 пациента. При 41 пациента се откриваше HCV RNA 6 месеца след лечение, т.е. релапс на болестта. Те заедно с още 5 пациента, прекратили лечението си на етап 24 седмица поради липса на отговор, обособиха групата на неотговорилите (NR; N=46)- 36% от болните. Пациентите с SVR (N=57) и част от пациентите с ETR (N=18), обособиха групата на отговорилите на терапията (R; N=75)- 58% от болните. За останалите 8 болни (6%) нямаше данни за отговора на терапията.

**Фигура 8. Терапия с IFN+Riba**



\*други – прекъснали поради странични ефекти или липса на ефект на етап 3-ти месец

**Таблица 29. Изходни характеристики на пациентите според отговора на терапията:**

Показател	Възраст (години)	HCV RNA (IU/ml)	Възраст (години)	HCV RNA (IU/ml)
Отговор на терапията	R		NR	
Брой (N)	75	75	46	46
Mean± SD	44±13.3	2 326 925±6 080 906	49±11.2	3 256 233±5 875 180
Median	44	433 232	51	1 495 706
Min.	20	6073	18	62 941
Max.	66	40 700 000	63	29 920 000

В групата пациенти, провели лечение с безинтерферонов режим, бяха включени 12 пациента (5 жени и 7 мъже), 11 от които приемаха медикаментите в продължение на 12 седмици, при един пациент лечението е с продължителност 24 седмици.

Вирусологичния отговор беше проследен изходно, на седмици втора, четвърта, дванадесета и 24-та (само за последния пациент) от лечението и 12 и 24 седмици след спирането му. Всички пациенти негативираха HCV RNA още на 2-ра седмица и до този етап на проследяване- 24 седмици след лечението, всичките 12 души са с негативна виремия- SVR 24 седмица.

## 2. Промени в нивата на хемоглобина и тромбоцитите:

### а. Промени в хемоглобиновите нива:

На таблицата са посочени стойностите на хемоглобина преди лечение, проследени по време на лечението и 6 месеца след това, при пациентите, провели лечение с интерферон и рибавирин.

**Таблица 30. Динамика в стойностите на хемоглобина при цялата група пациенти на лечение с IFN+Ribavirin:**

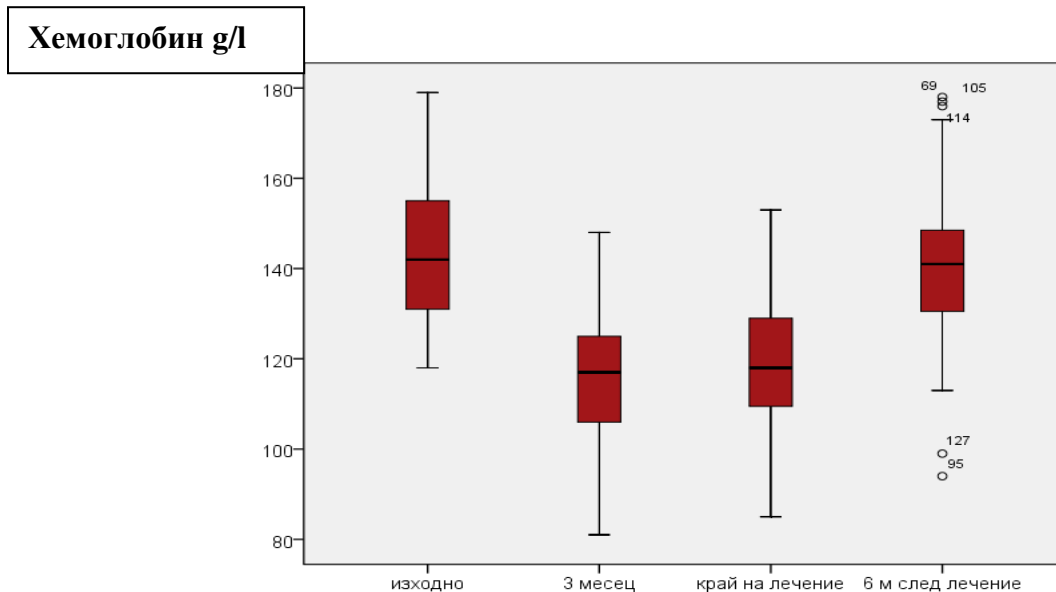
	изходно	3 месец	край на терапия	6 месеца след лечение	Значимост (p)*
Брой (N)	129	123	92	88	<b>0.000- 3 месец и в края спрямо изходно; 0.020- 6 месеца след лечение спрямо изходно</b>
Ср. ст. ±SD	144±14.6	116±14.3	120±15.9	142±16	
медиана	143	116	118	141	
Min.	109	81	85	94	
Max.	179	148	169	178	

\*Wilcoxon Signed Ranks Test

Общо за всички пациенти се наблюдаваше най-значим спад в стойностите на хемоглобина на трети месец, като този спад се наблюдава до края на лечението,

след което започва възстановяването на стойностите му при проследяване 6 месеца след лечение.

**Фигура 9. Динамика на стойностите на хемоглобина по време на терапията:**



При пациентите, отговорили на терапията (R) се отбелязва значим спад в стойностите на хемоглобина спрямо изходните стойности на 3-тия месец и в края на лечението ( $p=0.000$ ). Нямаше значима разлика между изходния хемоглобин и този, проследен 6 месеца след лечението.

**Таблица 31. Динамика на хемоглобина при пациенти, отговорили на терапията (R):**

R	изходно	3 месец	край на терапия	6 м след лечение	Значимост (p)*
Брой (N)	83	77	58	50	<b>0.000- 3 месец и край на лечението спрямо изходно;</b> 0.068-6 м след лечение спрямо изходно
Mean $\pm$ SD	143.6 $\pm$ 14.8	115.1 $\pm$ 14.3	118.1 $\pm$ 15	140,1 $\pm$ 16.1	
Median	143	116	117	139	

\*Wilcoxon Signed Ranks Test

**Таблица 32. Динамика на хемоглобина при NR:**

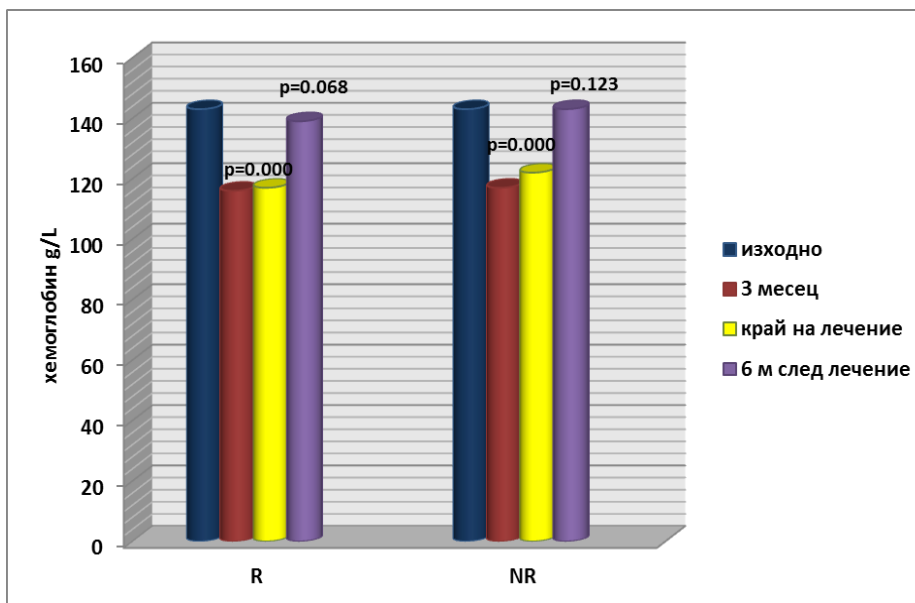
NR	изходно	3 месец	край на терапия	6 м след лечение	Значимост (p)*
Брой (N)	46	46	34	38	<b>0.000- 3 месец и край на лечението спрямо изходно;</b> 0.123-6 м след лечение спрямо изходно
Mean $\pm$ SD	145.5 $\pm$ 14.3	116.8 $\pm$ 14.6	122.2 $\pm$ 17.3	143.5 $\pm$ 15.9	
Median		117	122	143	

\*Wilcoxon Signed Ranks Test

В групата пациенти без отговор на лечението (NR) спадът в стойностите на хемоглобина на 3-тия месец и в края на терапията спрямо изходните стойности беше аналогичен на пациентите с отговор (R).

В конкретния случай, спадът на хемоглобина на 3-тия месец не би могъл да предскаже постигането на терапевтичен ефект, поради еднаквите промени при двете групи пациенти, разделени в зависимост от отговора на терапията.

**Фигура 10. Промени в хемоглобиновите нива по време на лечение при пациенти, отговорили на терапията (R) и неотговорили (NR):**



**Корелации на хемоглобина с показателите на възпалението:**

**Таблица 33.** Значими корелации на хемоглобина с показателите на възпалението през различните периоди на лечение:

Изходно N= 129	hsCRP	прохепсидин N= 40	3 месец	хаптоглобин	албумин	
хемоглобин	r= -0.174 p=0.048	<b>r= 0.364; p= 0.021</b>	хемоглобин	0.290; p= 0.002	r= 0.186 p=0.044	
край на лечение	хаптоглобин	албумин	6 месеца след лечение	A2MГ	албумин	IgG
хемоглобин	r= 0.251; p=0.041	<b>r= 0.522; p=0.000</b>	хемоглобин	r= -0.251; p=0.034	<b>r= 0.306; p=0.004</b>	r= -0.227; p=0.055

Изходно хемоглобинът корелираше в умерена степен единствено с изходните нива на прохепсидина; слаба корелация имаше на 3-ти месец от лечението с хаптоглобина,

значителна корелация имаше в края на лечението с нивата на албумина, както и 6 месеца след лечение, но в ниска степен.

### в. Промени в тромбоцитните нива:

Известно е, че спадът на тромбоцитния брой по време на лечение с интерферон е чест страничен ефект (68, 135). Проследихме динамиката в стойностите на тромбоцитите при пациентите, провели лечение с IFN+Ribavirin:

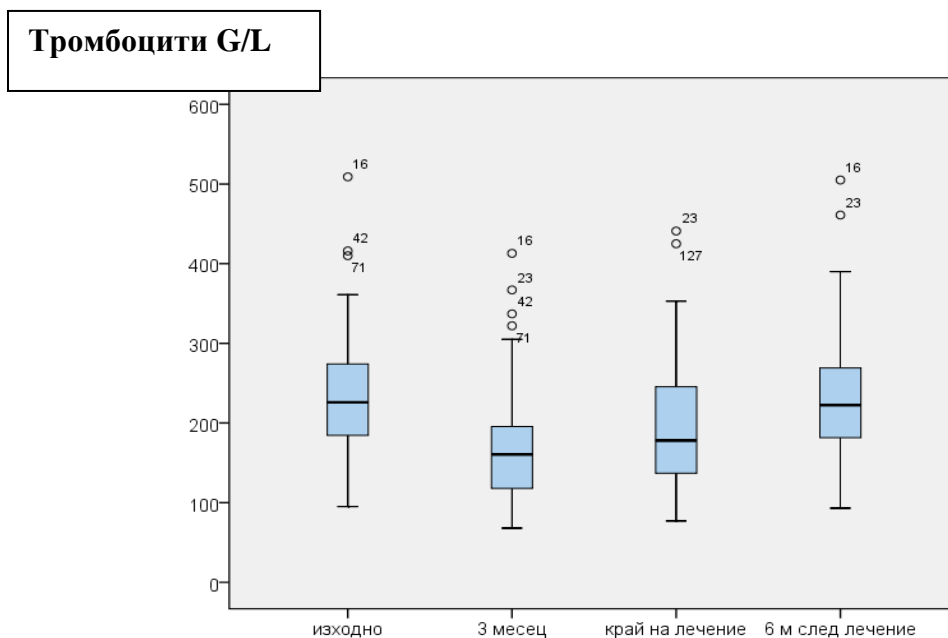
**Таблица 34. Динамика в стойностите на тромбоцитите при цялата група пациенти на лечение с IFN+Ribavirin:**

	изходно	3 месец	край терапия	на	6 месеца след лечение	Значимост (p)*
Брой (N)	129	122	91		89	<b>0.000<sup>1</sup></b> <b>0.238<sup>2</sup></b>
Ср. ст. ±SD	226±70	166±64	184±76		232±74	
медиана	217	160	176		222	
Min.	95	68	14		93	
Max.	509	413	441		505	

\*Wilcoxon Signed Ranks Test

<sup>1</sup>значимост 3 месец и край на лечението спрямо изходно; <sup>2</sup>значимост 6 м след лечение спрямо изходно

**фигура 11.** Промени в тромбоцитния брой по време на лечение:



Спадът на тромбоцитите по време на лечение беше най-значим на 3 месец и в края на лечението спрямо изходно. След като действието на интерферона е изчепано при проследяването след лечение, тромбоцитните нива се възстановяват до изходните.

Таблица 35. Динамика на тромбоцитите при пациенти, отговорили на терапията (R):

R	изходно	3 месец	край на терапия	6 м след лечение	Значимост (p)*
Брой (N)	83	76	57	50	0.000- 3 месец и край на лечението спрямо изходно 1.00-6 м след лечение спрямо изходно
Mean ±SD	229±71	166±67	189±83	240±79	
Median	217	159	161	214	

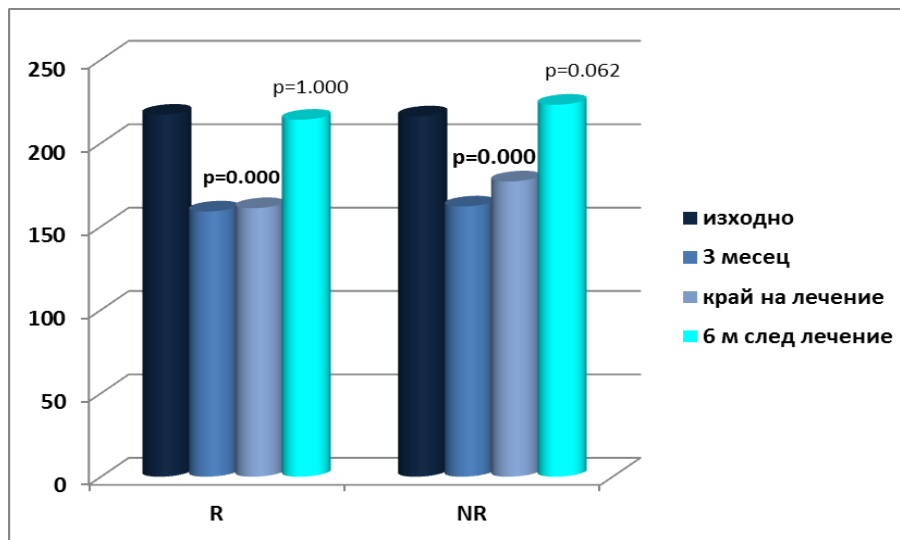
\*Wilcoxon Signed Ranks Test

Таблица 36. Динамика на тромбоцитите при NR:

NR	изходно	3 месец	край на терапия	6 м след лечение	Значимост (p)*
Брой (N)	46	46	34	39	0.000- 3 месец и край на лечението спрямо изходно; 0.062-6 м след лечение спрямо изходно
Mean ±SD	222±68	166±59	175±63	221±68	
Median	216	162	177	223	

\*Wilcoxon Signed Ranks Test

Фигура 12. Промени в тромбоцитните нива при R и NR:



Промените в нивата на тромбоцитите по време на лечение бяха аналогични и при двете групи в зависимост от отговора на терапията-значим спад на трети месец и в края на лечението. Проследени 6 месеца след лечението, стойностите при R се възстановяват до изходното ниво, а при NR- се покачват дори над изходните. Очевидно е, че в дадената ситуация и промените в стойностите на тромбоцитите по време на лечение, също както тези на хемоглобина, не биха могли да бъдат белег за разграничаване на отговорили от неотговорили на терапията.

### Корелации на тромбоцитите с показателите на възпалението:

Таблица 37. Значими корелации на тромбоцитите с показателите на възпалението през различните периоди на лечение:

Изходно N= 129	A2MГ	hsCRP	хаптоглобин	3 месец	хаптоглобин
тромбоцити	r= -0.201; p=0.022	r= 0.198; p= 0.024	<b>r= 0.439; p= 0.000</b>	тромбоцити	0.194; p= 0.037 (Pearson's Correlation)
край на лечение	хаптоглобин	hsCRP	6 месеца след лечение	хаптоглобин	
тромбоцити	r= 0.247; p=0.044 N=67	<b>r= 0.506; p=0.000 N=88 (Pearson's Correlation)</b>	тромбоцити	<b>r= 0.328; p=0.005 N=72</b>	

Изходно тромбоцитите корелираха положително в умерена степен с хаптоглобина, на третия месец-много слабо отново с хаптоглобина. В края на лечението имаше изразена корелация с hsCRP, а 6 месеца след лечението-тромбоцитите корелираха с умерена степен отново хаптоглобина. Вероятно тези връзки на тромбоцитите с хаптоглобина се дължат на факта, че и двата показателя отразяват в известна степен активността на чернодробната болест и същевременно и двата показателя търпят еднопосочна промяна вследствие на действието на медикаментите.

По отношение на скоровите системи за неинвазивна оценка на фиброзата и фиброгенезата, очаквано имаше висока обратна корелация на тромбоцитите със скоровите, в чиито състав участват-APRI и FIB-4 (изходно съответно r= -0.555 и p= -0.637); (6 месеца след лечение съответно r= -0.535 и r= -0.603). Умерена негативна корелация имаше с изходния SOS FS r= -0.309, с GAMAGEN и M-GAMAGEN имаше слабо изразени отрицателни корелации изходно и 6 месеца след лечение.

### 3. Динамика на показателите на възпалението по време на лечение:

Таблица 38. Динамика в стойностите на показателите на възпалението, виремията и някои рутинни лаборатораторни показатели през различните периоди на проследяване:

показател	N	изходно		N	3 месец		N	Край на терапия		N	6 м след терапия	
		M±SD	median		M±SD	median		M±SD	median		M±SD	median
A2MG	129	3.18±1.02	3.2	118	2.90±0.90	2.99	98	2.40±0.92	3.0	72	3.26±1.01	3.3
hsCRP	129	1.15±2.19	0.5	118	1.13±1.75	0.6	95	1.07±1.79	0.5			
TNF-a	31	78.07±74.28	55.67	31	66.98±67.34	55.67	17	64.21±65.08	42.33			
хептоглобин	129	0.92±0.52	0.85	118	0.77±0.62	0.75	67	0.97±0.69	0.86	72	1.12±0.53	1.05
HCV RNA	129	2 601 193 ±5 832 784	777 866	123	69 549±317 898	0.0	102	160 795 ±884 175	0.0	98	639 444±1 505 902	0.0
IgG	98	13.58±3.26	13.25				67	13.28±3.36	13.09	72	12.96±3.28	12.53
ALAT	129	89±51.13	77							89	45±54.19	31.7
албумин	124	47.03±3.66	46.95	117	44.65±3	45.0	91	44.35±3.3	44.0	87	46.1±3.13	45.8
прохепсидин	40	754.72±295.3	805.7	40	591.6±312.4	650.2	35	516.96±329.5	540.5			

Таблица 39. Динамика на показателите на възпалението и HCV RNA (Wilcoxon Signed Ranks):

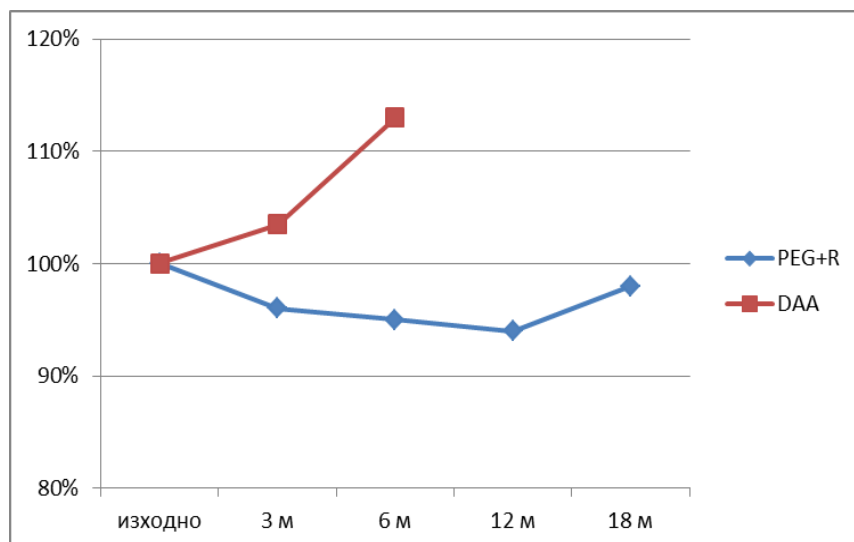
показател	изходно↔ 3 месец (Z; p)	изходно↔край на терапия (Z; p)	3 месец↔край на терапия (Z; p)	край на терапия↔6 м след терапия (Z; p)	изходно↔ 6 м след терапия (Z; p)
A2MG	<b>-5.115; 0.000</b> N=118	<b>-2.412; 0.016</b> N= 98	-1.947; 0.051 N= 98	<b>-2.815; 0.005</b> N= 62	-1.747; 0.081 N= 72
hsCRP	-0.078; 0.938 N= 118	-0.614; 0.539 N= 95	-1.791; 0.073 N= 95		
TNF-a	-1.529; 0.126 N=31	-0.308; 0.758 N= 17	-0.355; 0.723 N= 17		
хептоглобин	<b>-3.458; 0.001</b> N= 118	-1.154; 0.249 N= 67	<b>-1.981; 0.048</b> N= 67	<b>-2.971; 0.003</b> N= 62	<b>-2.813; 0.005</b> N= 72
HCV RNA	<b>-9.182; 0.000</b> N= 123	<b>-7.830; 0.000</b> N= 102	-0.145; 0.884 N= 102	<b>-4.298; 0.000</b> N=92	<b>-5.771; 0.000</b> N=98
IgG		-0.933; 0.351 N= 67		<b>-2.258; 0.024</b> N= 62	<b>-2.725; 0.006</b> N= 72
албумин	<b>-6.975; 0.000</b> N=114	<b>-6.278; 0.000</b> N=88	-1.698; 0.089 N= 88	<b>-5.323; 0.000</b> N=75	<b>-3.249; 0.001</b> N=86
прохепсидин	<b>-2.889; 0.004</b> N=40	<b>-3.207; 0.001</b> N=35	-1.547; 0.122 N=35		

### а. Серумен албумин

**Таблица 40. Промяна в нивата на албумина (g/L) по време на лечение с два режима при болни с хроничен хепатит С (t – test за чифтни данни):**

режим	изходен	3 м. лечение	12 м. лечение	Проследяване след лечение
PEG+RIBA (M±SD)	46,7±2,30	44,9±3,09	43,9±3,08	45,7±2,83
Изходен PEG+RIBA		p=7,0975E-07	p=1,62E-09	p=0,00176
12 м. лечение				p=2,52057E-06
DAA (median)	42,5	44		48
Изходен		p=0,255		p=0,002
3 м. лечение				p = 0,001393

**Фигура 13. Промени в стойностите на албумина, съпоставени при двата различни режима на терапия:**



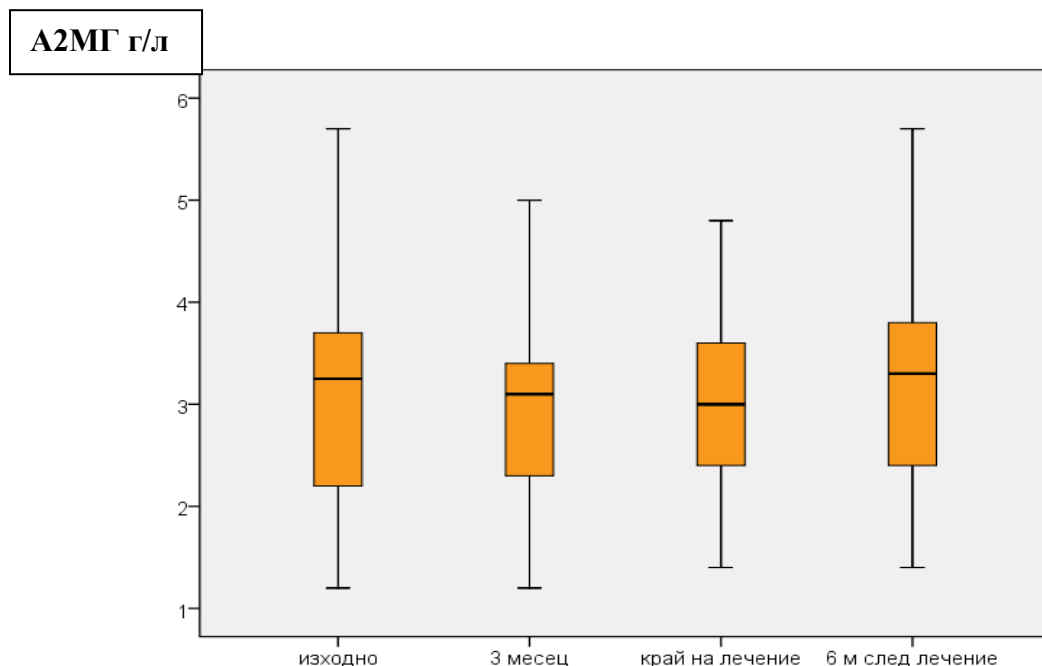
Лечението с интерферон и рибавирин причинява намаление на серумния албумин още от третия месец на лечение, като то е най-изразено в края на лечението, а 6 месеца след спирането му, серумния албумин се повишава по отношение на края на лечението и не достига нивата си преди терапия.

Обратен ефект се наблюдава при безинтерферонов режим – албуминът се повишава още на третия месец, който в тези случаи е бил край на лечението и продължава да се повишава 3 месеца след преустановяване на ефективното лечение (t – test за чифтни данни).

### в. Серумен Алфа 2-макроглобулин:

В нивата на А2МГ за всички пациенти, провели лечение с IFN+Ribavirin, се отбеляза значим спад на 3-тия месец от терапията, който се задържа до края на лечението, след което нивата се възстановиха до незначимо малко по-високи от изходните.

**Фигура 14.** Обобщени промени в нивата на А2МГ по време на лечението:



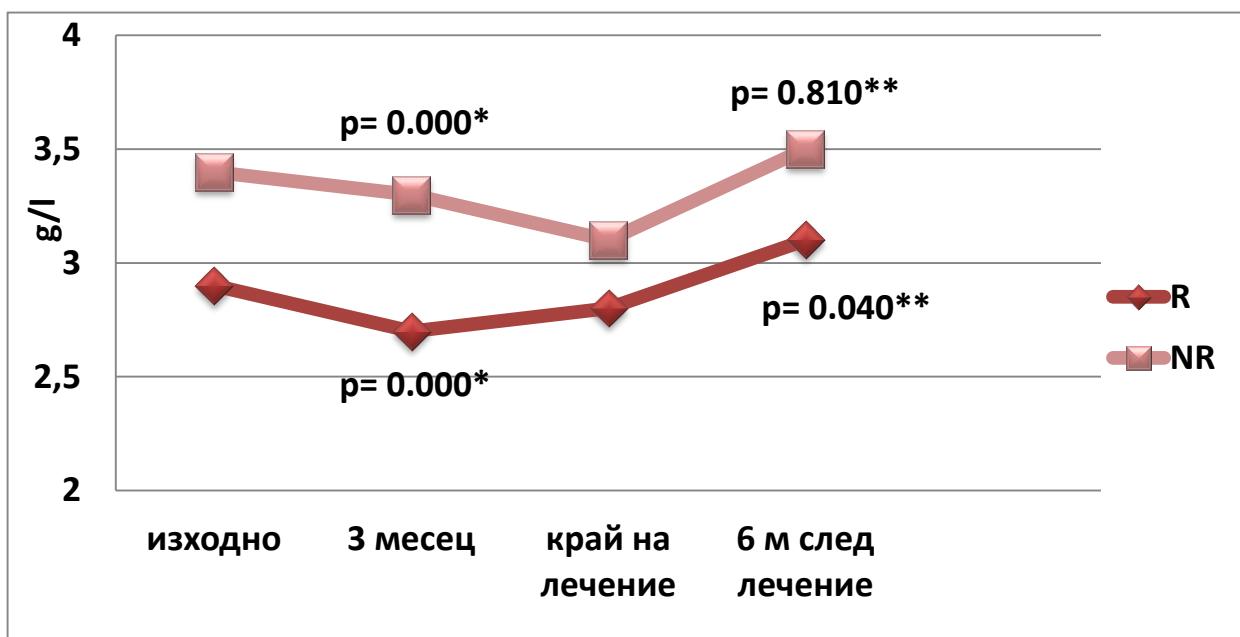
Имаше значима разлика в нивата на А2МГ в зависимост от отговора на терапията.

Пациентите без отговор на лечението (NR) имаха по-високи стойности на А2МГ през всички периоди на проследяване. При тях имаше значим спад на 3 месец от терапията и в края ѝ, проследени 6 месеца след лечението- нямаше разлика с изходните нива на А2МГ. При отговорилите на терапията (R) имаше най-значим спад на 3-ти месец от началото, а 6 месеца след лечението имаше значимо покачване на А2МГ спрямо изходно.

**Таблица 41.** Стойности на А2МГ при R и NR:

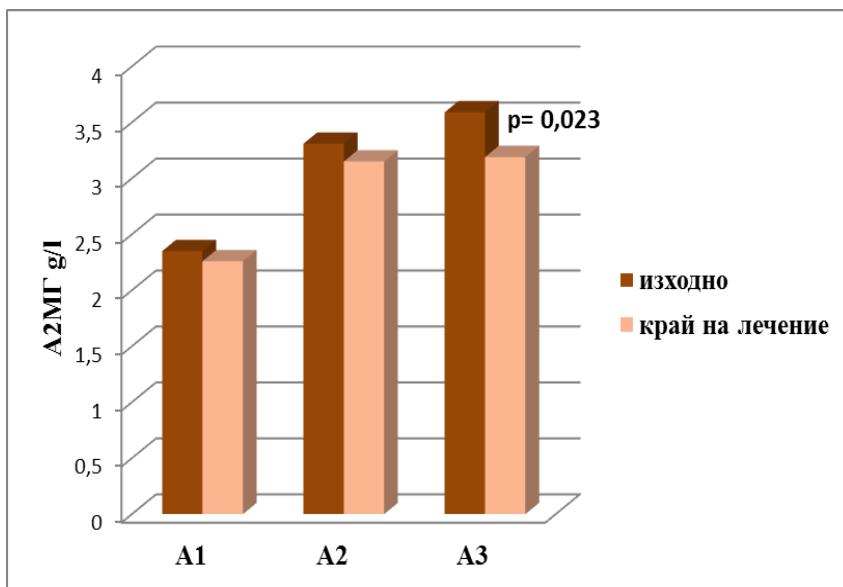
група	период	Брой N	mean±SD	median
R	изходно	83	3.1±1	2.9
	3 месец	73	2.7±0.8	2.7
	край на лечение	62	2.8±0.9	2.8
	6 м след лечение	40	3.1±1.1	3.1
NR	изходно	46	3.4±1	3.4
	3 месец	45	3.1±1	3.3
	край на лечение	36	3.1±0.95	3.1
	6 м след лечение	32	3.4±0.9	3.5

**Фигура 15.** Промени в нивата на А2МГ в зависимост от отговора на терапията:



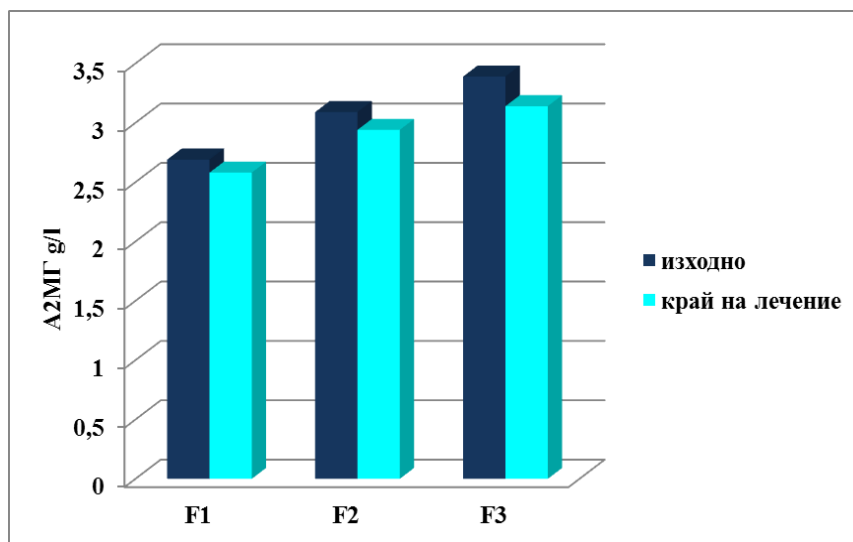
\*значимост 3 м спрямо изходно    \*\*значимост 6 м след лечение спрямо изходно

**Фигура 16.** Промени в нивата на А2МГ в края на лечението спрямо изходно в зависимост от хистологичната активност:



Средните стойности на А2МГ в края на лечението, групирани според степента на некроинфламаторната активност бяха съответно:  $2,26 \pm 0,70$  при А1;  $3,15 \pm 0,83$  при А2 и  $3,19 \pm 1,05$  при А3. Единствено при пациенти със степен на активност А3 на чернодробната болест се наблюдаваше сигнификантен спад на А2МГ в края на лечението ( $p=0,023$ ). Такъв спад нямаше при пациенти с А1 ( $p=0,132$ ) и А2 ( $p=0,417$ ).

**Фигура 17.** Промени в нивата на А2МГ в края на лечението спрямо изходно в зависимост от стадия на фиброза:



Средните стойности на А2МГ в края на лечението при различните стадии на фиброза бяха съответно:  $2,58 \pm 0,88$  при F1;  $2,94 \pm 0,90$  – при F2 и  $3,14 \pm 0,84$  – при F3. Не се наблюдаваше статистически значим спад в стойностите на А2МГ в края на лечението

спрямо изходно при изходен стадий на фиброзата съответно F1 ( $p=0.368$ ), F2 ( $p=0.482$ ) и F3 ( $p=0.114$ ).

За да си обясним промените при нивата на А2МГ, проследен през цялото лечение и след приключването му, проследихме промените при двете групи пациенти с най-тежка чернодробна болест: А3 и F3. На таблицата са показани медианите:

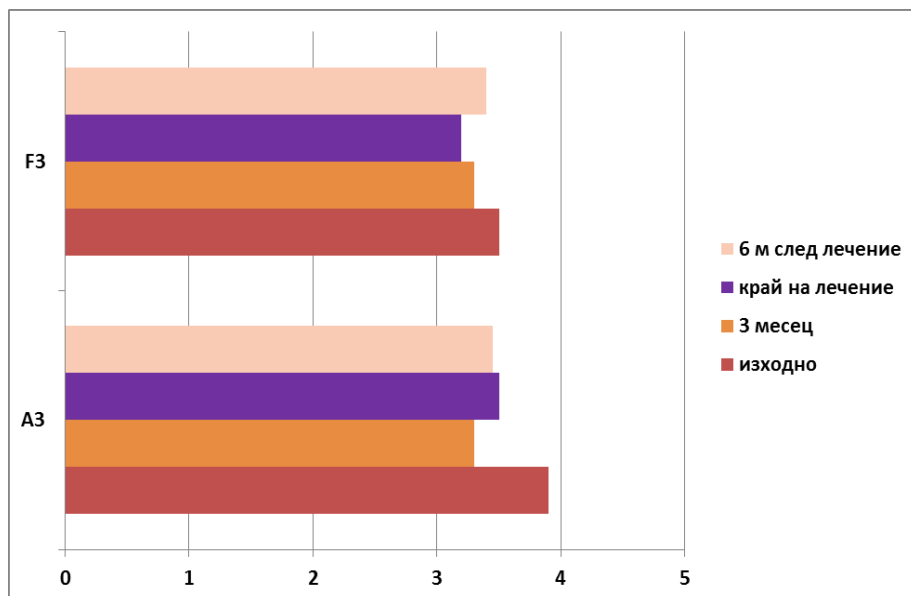
**Таблица 42.** Медиани на А2МГ при пациенти с хистологична активност А3 и стадий на фиброза F3:

<b>A3</b>	median	<b>F3/F4</b>	median
изходно	3.9	изходно	3.5
3 месец	3.3	3 месец	3.3
край на лечение	3.5	край на лечение	3.2
6 м след лечение	3.45	6 м след лечение	3.4

Установихме, че при пациентите с най-изразена степен на некро-инфламаторна активност се наблюдаваше стихване на възпалението в края на лечението ( $p=0.023$ ), както беше посочено по-горе и макар и незначимо, А2МГ продължава да спада и 6 месеца след лечението. При проследяване на стойностите при F3, оказва се, че нивата спадат, докато продължава лечението и след което се възстановяват почти до изходните.

**Вероятно тези най-тежко болни с начална или вече оформена цироза са една от причините стойностите на А2МГ в цялата група да нарастват след лечение, тъй като чернодробната болест пресиситира дори след успешно ерадикиране на вируса на HCV и съответно неоткриваема HCV RNA 6 месеца след лечение.**

**Фигура 18.** Промени в стойностите на А2МГ през етапите на проследяване при А3 и F3:



Като цяло обаче, това покачване на А2МГ в края на лечението не е зависимо от некро-инфламаторната активност или стадия на фиброзата по METAVIR. На таблицата се представени средните стойности на А2МГ през различните етапи на проследяване в зависимост от активността и фиброзата:

**Таблица 43.** А2МГ според различните степени на активност и стадии на фиброзата:

A2M	A1	A2	A3	F1	F2	F3
Изх	2.3±0.8	3.4±0.9	3.6±1	2.7±1.1	3.1±0.9	3.4±0.9
3 м	2.2±0.7	3.1±0.7	3.3±1	2.5±0.9	2.8±0.8	3.3±0.9
Край	2.3±0.7	3.1±0.8	3.1±1.1	2.6±0.9	2.9±0.9	3.1±0.8
6 м след	2.5±0.9	3.5±1	3.6±0.7	3.1±1.2	3.3±1	3.4±0.9

От таблицата се вижда, че пациенти с F1 стадий на фиброзата повишават най-значимо А2МГ след лечение ( $p=0.040$ ). Тенденцията на промените е еднаква при всички А1-А3 и F1-F3 за А2МГ-спада на 3-ти месец и след лечение е сходен или по-висок от изходния-т.е. промените не зависят от активността и фиброзата.

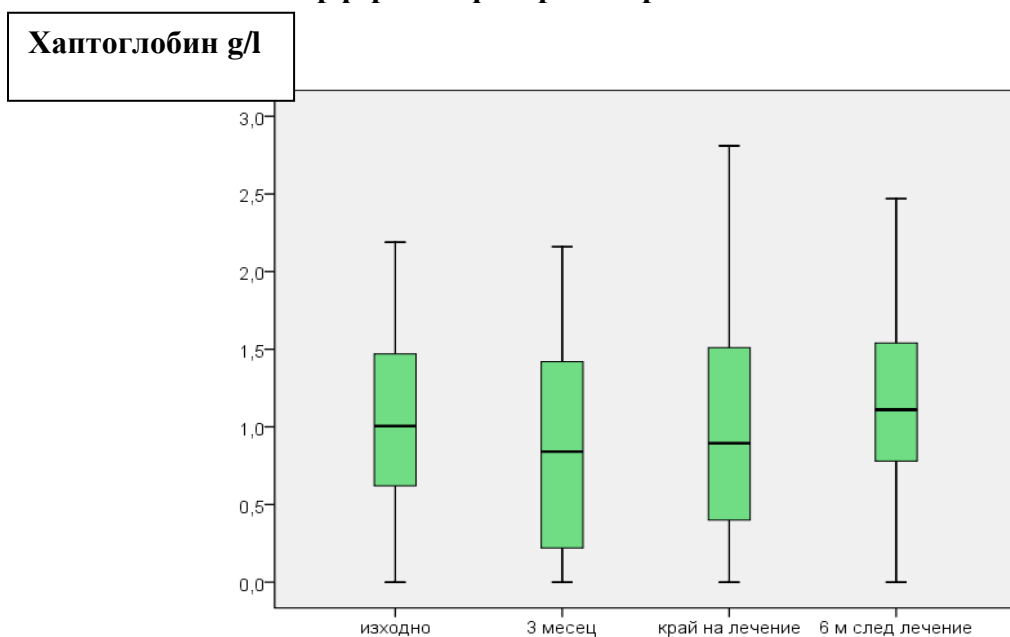
**Възможно е причината за това покачване на А2МГ след лечение да е свързано с изчерпване на действието на интерферона и отпадане на супресивния му ефект върху протеиновия синтез.**

### с. Хаптоглобин:

По отношение на хаптоглобина се установи значим спад в стойностите му на третия месец от терапията, след което проследен 6 месеца след лечението, се забеляза значимо възстановяване, дори над изходните нива. Известно е, че страничен ефект от

лечението с Рибавирин, е наблюдаваната хемолиза и съответно анемичен синдром, което е белег на това, че медикаментът действа. Сама по себе си хемолизата води до изчерпване на хаптоглобина, с което се обяснява и спадът на 3-тия месец от лечението. Покачването на хаптоглобина след лечение може да се обясни с отпадането на действието на медикаментите.

**Фигура 19. Серумни нива на хаптоглобин преди и по време на лечение с интерферон алфа и рибавирин:**



На таблицата са показани средните стойности и медиани на хаптоглобина според отговора на терапията.

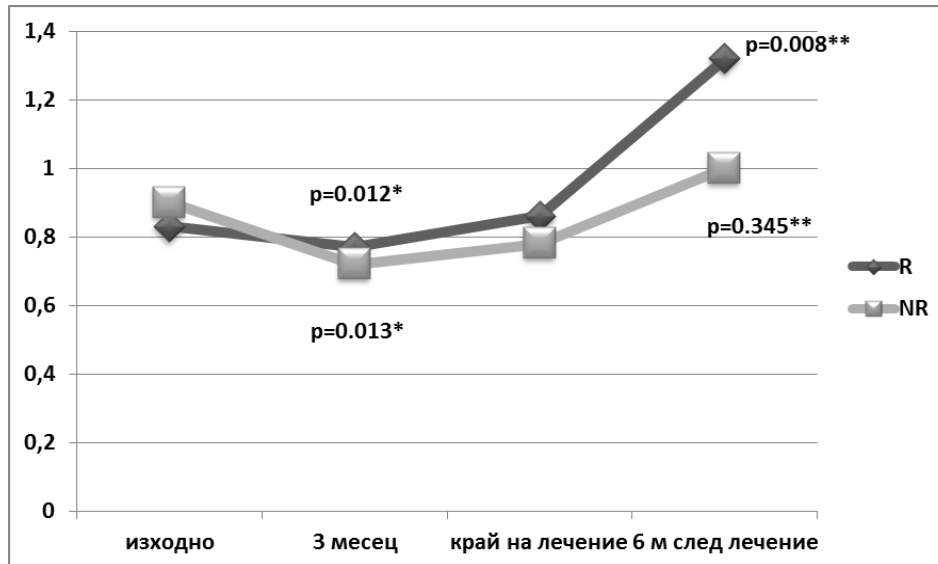
**Таблица 44. Стойности на хаптоглобин при R и NR**

група	период	Брой N	mean±SD	median
R	изходно	84	0.92±0.5	0.83
	3 месец	78	0.78±0.62	0.77
	край на лечение	51	0.93±0.63	0.86
	6 м след лечение	52	1.23±0.47	1.32
NR	изходно	46	0.89±0.53	0.9
	3 месец	45	0.72±0.6	0.72
	край на лечение	25	1±0.74	0.78
	6 м след лечение	32	1.04±0.6	1

При пациентите с отговор на терапията (R) се отчете значим спад на стойностите на хаптоглобина на третия месец и значимо покачване 6 месеца след приключване на

лечението, което е благоприятен белег. При NR аналогично имаше значим спад на 3 месец от терапията, а стойностите след лечение не се различаваха значимо от изходните.

**Фигура 20.** Промени в нивата на хаптоглобин при R и NR:



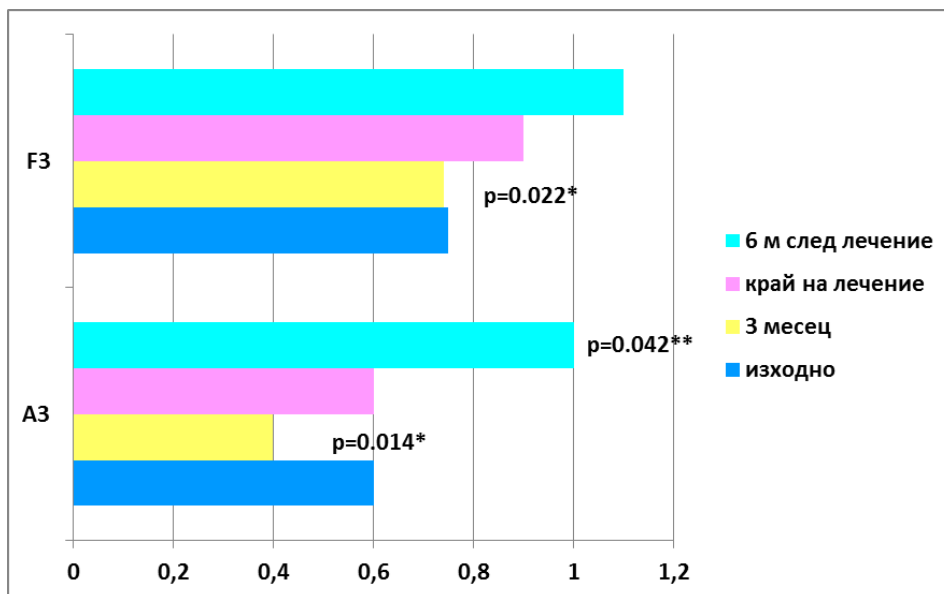
За да си обясним цялостните промени и в нивата на хаптоглобина при проследяване, аналогично на А2МГ, отделихме пациентите с най-тежка чернодробна болест- А3 и F3. На таблицата по-долу са представени медианите по време на лечение.

**Таблица 45.** Медиани на хаптоглобин при пациенти с хистологична активност А3 и стадий на фиброза F3:

<b>А3</b>	median	<b>F3/F4</b>	median
изходно	0.6	изходно	0.75
3 месец	0.4	3 месец	0.74
край на лечение	0.6	край на лечение	0.9
6 м след лечение	1	6 м след лечение	1.1

При пациентите с най-тежка чернодробна болест, също както и при А2МГ, хаптоглобинът спада на 3-тия месец (евентуална супресия от интерферона и хемолiza от рибавирин) и се покачване след лечение. На фигурата долу са показани промените в стойностите на хаптоглобина през периодите на проследяване.

**Фигура 21.** Промени в стойностите на хаптоглобин през етапите на проследяване при А3 и F3:



\*значимост 3 месец спремо изходно

\*\*значимост 6 месеца след лечение спрямо изходно

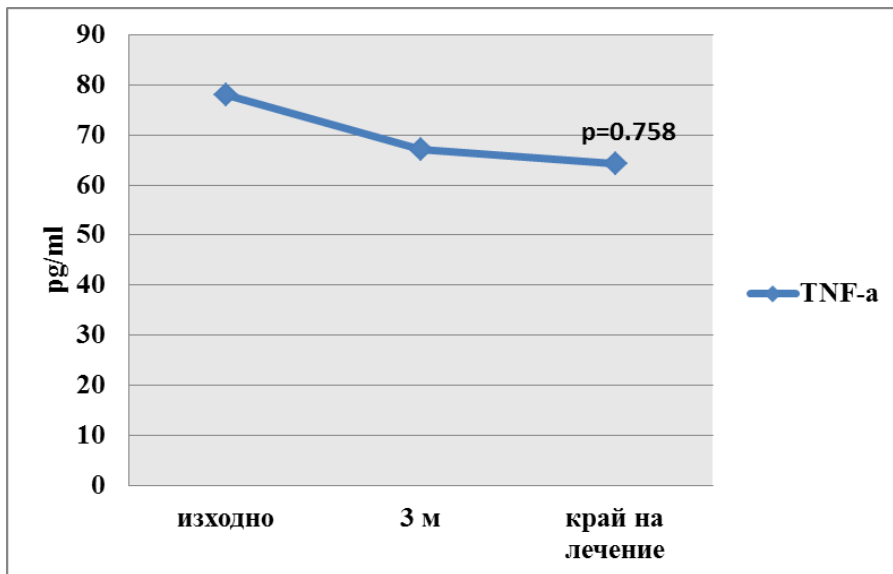
Както се вижда от фигурата и при двете групи има значим спад на 3 месец под действието на интерферона и рибавирин, а след приключването на лечението има значимо покачване на стойностите над изходните, когато се изчерпва действието на медикаментите.

Като извод от коментираните промени в нивата на А2МГ и хаптоглобина по време на лечение и след това, е че при неинвазивната оценка на чернодробната фиброза, трябва да се използват освен скорови модели, включващи компоненти на чернодробното възпаление, също така и по-прости показатели.

#### d. TNF-a, hsCRP, IgG:

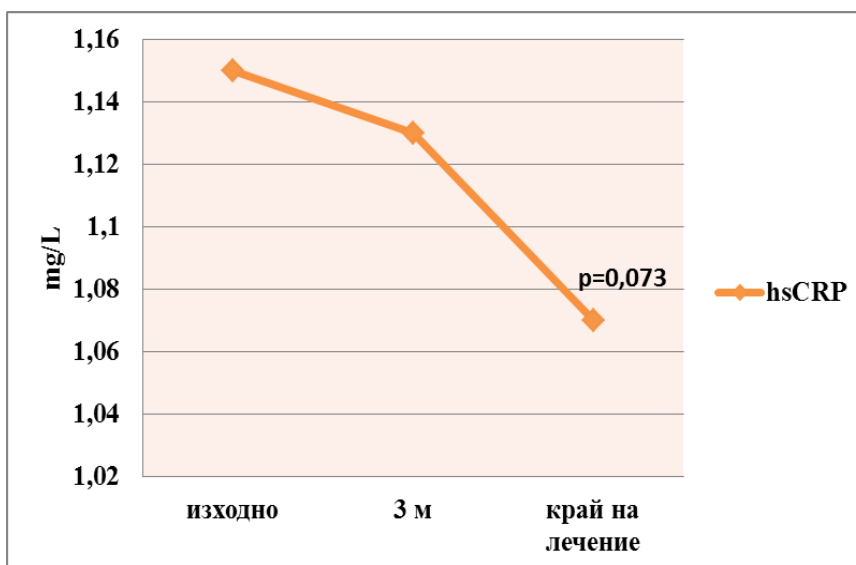
Не се наблюдава значим спад в стойностите на TNF-a по време на лечението.

**Фигура 22.** Промени в стойностите на TNF-a по време на лечението:



Аналогично нямаше разлика в стойностите на hsCRP проследени през етапите на лечение.

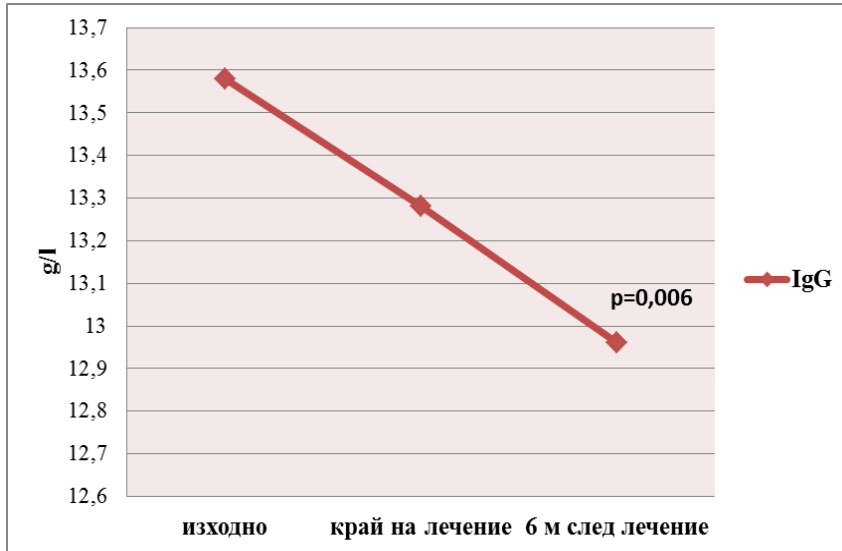
**Фигура 23.** Промени в стойностите на hsCRP по време на лечение:



Параметрите hsCRP и TNF-a не се променят по време на лечението, вероятно защото едногодишното лечение е твърде кратък период за обратното развитие на болестта. Необходимо е проследяването им и след лечение за да се оценят адекватно промените им и съответно значението им за оценката на ефекта от лечението и промените в чернодробното увреждане.

Стойностите на IgG се промениха значимо чак 6 месеца след лечението, което би могло да се дължи на подтискането му от действието на PEG-интерферона, което продължава и след спирането на лечението.

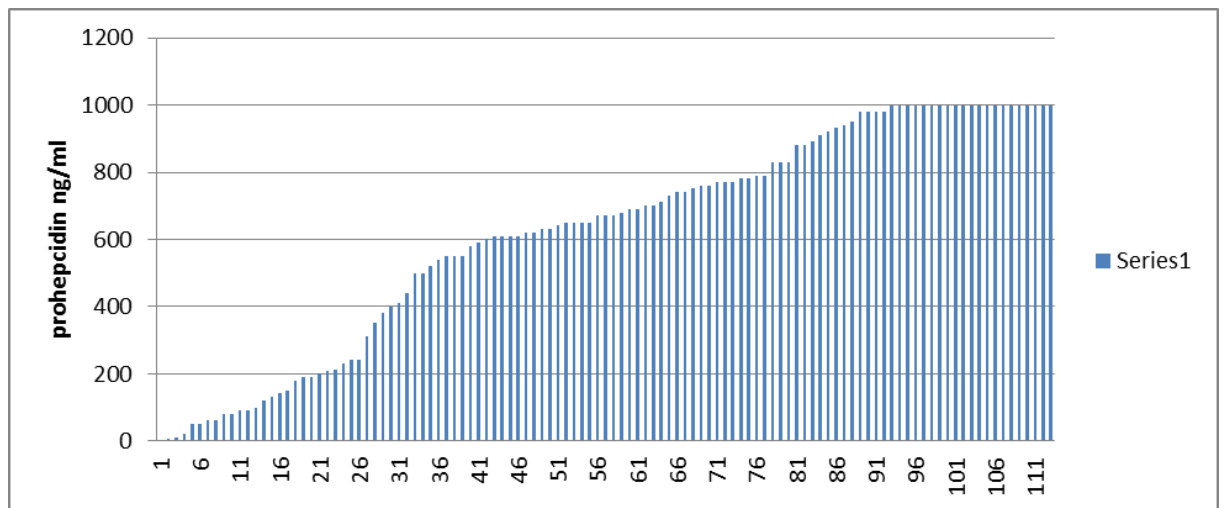
**Фигура 24.** Промени в IgG по време на лечение:



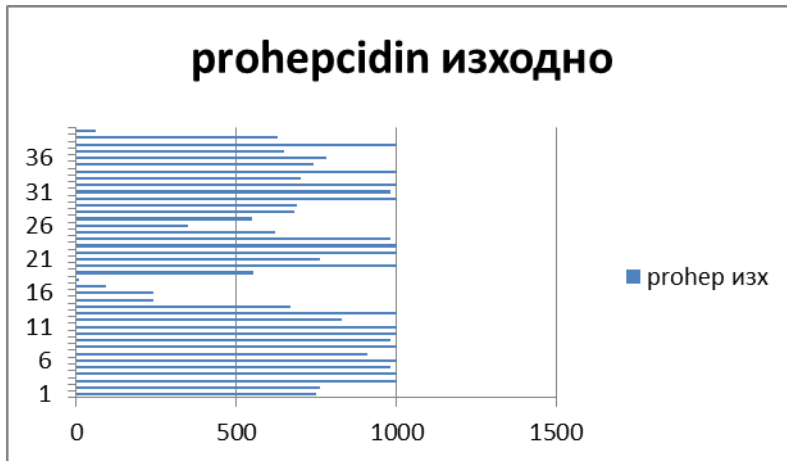
**е. Прохепсидин:**

**Фигура 25.** Графика на стойностите на прохепсидина при всички изследвани лица обобщено (A) и за трите периода на проследяване поотделно (B, C, D):

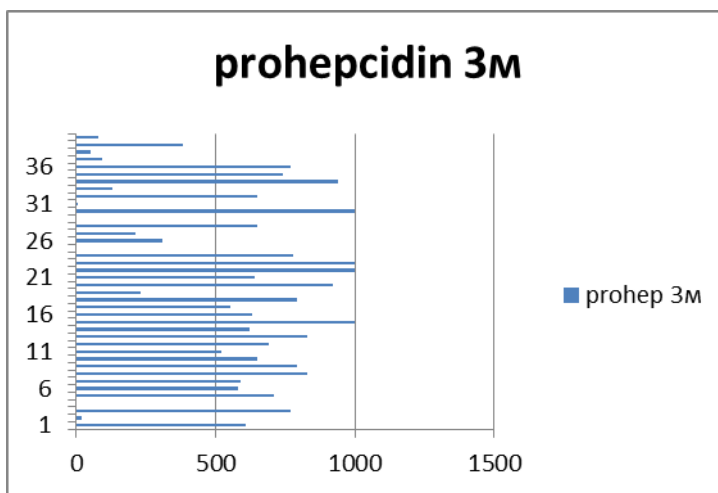
A)



B)



C)



D)

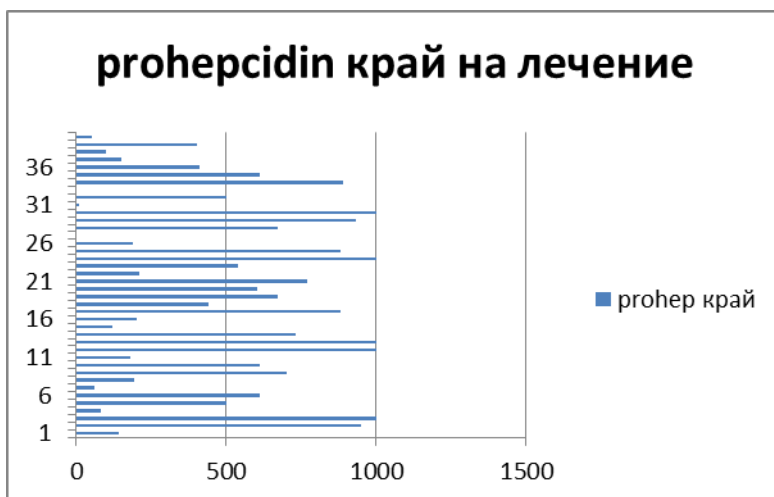
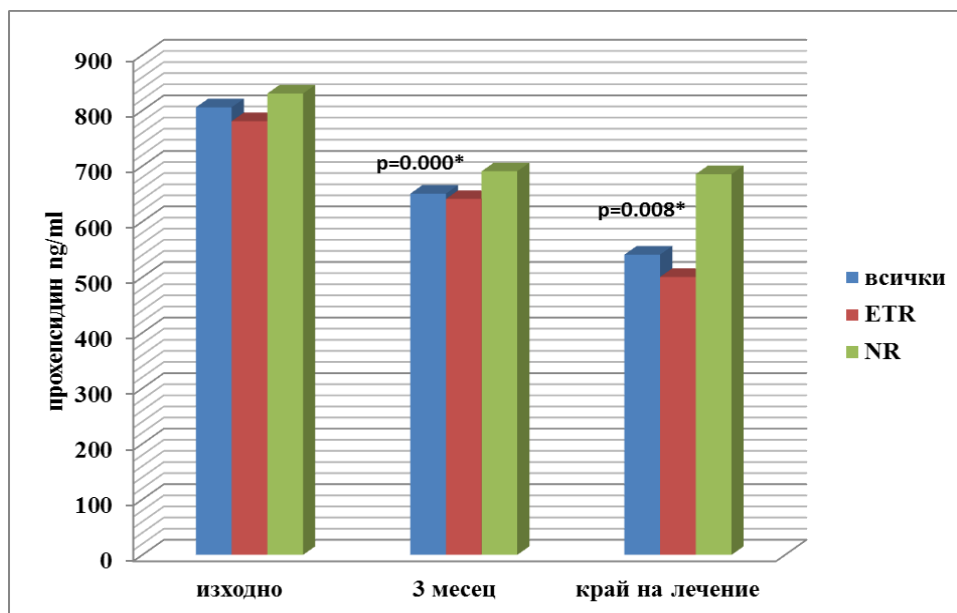


Таблица 46. Динамика на прохепсидин (група В):

показател	изходно	3 месец	край на терапия
Брой (N)	40	40	35
Mean $\pm$ SD	754,72 $\pm$ 295,31	591,58 $\pm$ 312,40	516,96 $\pm$ 329,52
Median	805,65	650,15	540,50
Min.	6,10	4,30	10,15
Max.	1000	1000	1000

**Фигура 26. Серумни нива на прохепсидин преди и по време на лечение с интерферон алфа и рибавирин.**



**\*значимост за цялата група В**

Общо за всички лекувани пациенти в група В се установи статистически значима разлика между изходните стойности на прохепсидина и тези на третия месец, както и в края на лечението спрямо изходните ( $p=0.000$ ;  $p=0.008$ ). Тъй като параметърът прохепсидин беше изследван преди лечение, на 3-ти месец и в края на лечение, разделихме пациентите от тази група В в две подгрупи- група с отговор в края на лечението (ETR) и група без отговор на терапията (NR).

Общо за всички пациенти в група В не се отбеляза връзка между стойностите на прохепсидина с тези на АЛАТ преди и по време на лечението с интерферон алфа и рибавирин.

**Таблица 47. Зависимости между стойностите на прохепсидин и АЛАТ през различните периоди на проследяване:**

АЛАТ	изходно	3 месец	край на терапия
прохепсидин изходно	N= 40; p= 0.078	N=38; p= 0.935	N=29; p= 0.928
прохепсидин 3 месец	N=40; p=0.567	N=38; p= 0.925	N=29; p= 0.930
прохепсидин край на терапия	N=35; p= 0.528	N=33; p= 0.750	N=28; p=0.933

На таблица 46 са показани изходните характеристики на пациентите, постигнали отговор в края на лечението (ETR).

**Таблица 48. Изходни характеристики на пациентите с ETR:**

Показател	Прохепсидин (ng/ml)
Брой (N)	29
Mean	740,9
Median	780,7
± SD	319,9
Min.	6,1
Max.	1000,0

В групата на пациентите с ETR се очерта статистически значим спад в стойностите на прохепсидина на третия месец и в края на лечението спрямо изходните стойности (p=0.023; p=0.005).

**Таблица 49. Динамика в стойностите на прохепсидин при пациенти, постигнали отговор в края на лечението (ETR) N=29:**

параметър	Mean ± SD	Median	Значимост (p)
прохепсидин изходно	740.9 ± 319.9	780.7	<b>0.023</b>
прохепсидин 3 месец	590.3 ± 328.9	640.7	
прохепсидин край на терапия	490.8 ± 328.9	500.3	

На таблица 11 са показани изходните характеристики на пациентите, неотговорили на лечението (NR):

**Таблица 50. Изходни характеристики на пациентите нонреспондери:**

Показател	Прохепсидин (ng/ml)
Брой (N)	9
Mean	794,8
Median	830,6
± SD	227,5
Min.	350,5
Max.	1000,0

Промените в нивата на прохепсидина при пациентите NR не достигнаха статистическа значимост по време на лечението с интерферон алфа и рибавирин.

**Таблица 51. Динамика в стойностите на прохепсидин при неотговорили на терапията пациенти (NR):**

параметър	Mean ± SD	Median	Значимост (p)
прохепсидин изходно	794.79 ± 227.5	830.6	0.260
прохепсидин 3 месец	631.6 ± 282.6	690.5	
прохепсидин край на терапия	623.6 ± 367.5	685.3	0.225

Преди лечение прохепсидинът корелираше в умерена степен с хемоглобина ( $r=0.364$ ;  $p=0.021$ ). Такава корелация не бе наблюдавана между прохепсидина и хемоглобина през различните периоди на лечението.

В групата пациенти с HCV генотип 1 се установи статистически значим спад в стойностите на прохепсидина на третия месец ( $p=0.028$ ) и в края на лечението ( $p=0.013$ ) спрямо изходните стойности. При тях също така се установи положителна корелация между изходните стойности на HCV RNA и прохепсидина ( $Spearman=0,445$ ;  $p=0,009$ ). Подобна корелация не беше установена при пациентите с генотип 3. При пациентите с генотип 3 също се установи спад в нивата на прохепсидина, но едва в края на лечението ( $p=0,018$ ) спрямо изходните стойности.

## 4. Промяна на скоровите системи по време на лечение:

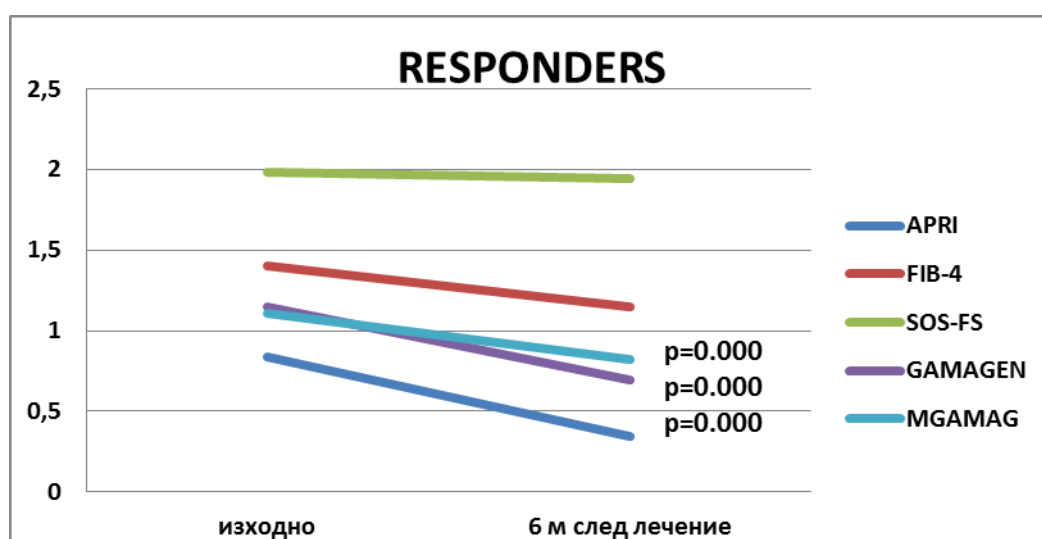
### 4.1. Скорове при терапия с pegIFN+Riba:

На таблицата са показани средните стойности и медианите на скоровите системи при пациентите на IFN+Ribavirin:

**Таблица 52.** Стойности на скоровете в динамика при пациенти, провели лечение с IFN+Ribavirin:

	N=	mean $\pm$ SD	median
<b>GAMAGEN изходно</b>	98	1,28 $\pm$ 0,67	1,21
<b>GAMAGEN край на терапия</b>	67	0,91 $\pm$ 0,54	0,81
<b>GAMAGEN 6 м след терапия</b>	72	0,97 $\pm$ 0,69	0,90
<b>M-GAMAGEN изходно</b>	129	1,23 $\pm$ 0,77	1,13
<b>M-GAMAGEN край на терапия</b>	98	0,86 $\pm$ 0,52	0,75
<b>M-GAMAGEN 6 месеца след терапия</b>	72	1,06 $\pm$ 0,63	0,95
<b>APRI изходно</b>	129	0,87 $\pm$ 0,71	0,61
<b>APRI 6 м след терапия</b>	83	0,58 $\pm$ 0,66	0,39
<b>FIB-4 изходно</b>	129	1,56 $\pm$ 1,21	1,22
<b>FIB-4 6 м след терапия</b>	83	1,47 $\pm$ 1,23	1,19
<b>SOS FS изходно</b>	126	2,22 $\pm$ 1,26	2,25
<b>SOS FS край на терапия</b>	63	1,98 $\pm$ 1,15	2,05
<b>SOS FS 6 м след терапия</b>	71	2,12 $\pm$ 1,23	2,32

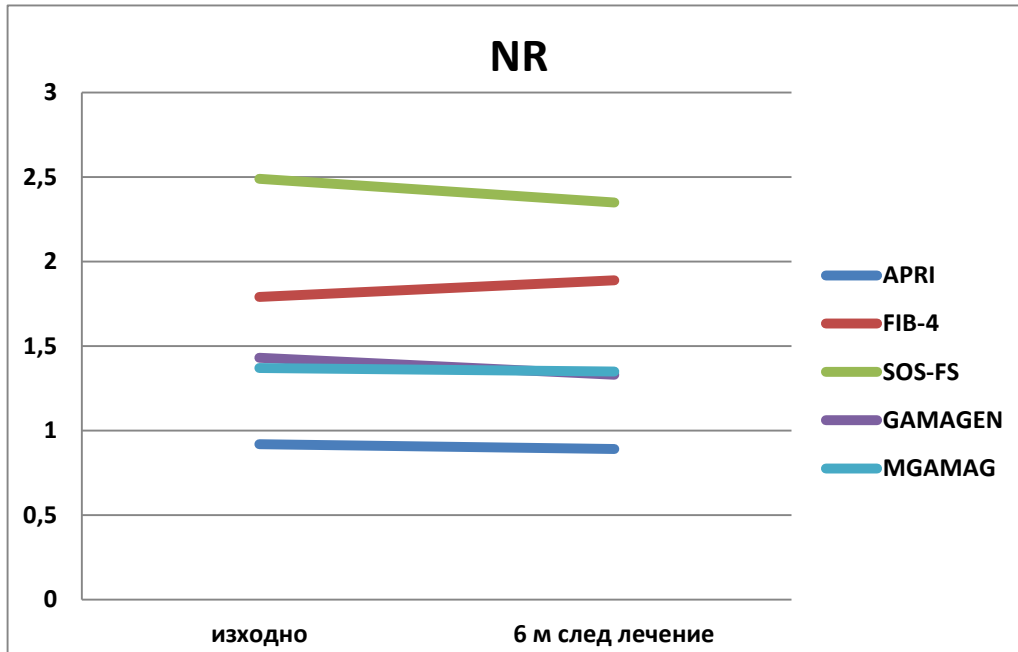
**Фигура 27.** Промени в скоровите системи при пациенти, отговорили на терапията (Responders):



Разделени по групи на такива пациенти, които са отговорили на терапията и такива неотговорили, то в групата на успешно лекуваните пациенти (SVR, N= 75) се

наблюдава статистически значим спад в стойностите на скоровите системи за неинвазивна оценка на фиброза и фиброгенеза. Това е най-значимо за GAMAGEN, M-GAMAGEN и APRI (виж фиг. 26)

**Фигура 28.** Промени в нивата на пациентите, неотговорили на терапията (NR):



В групата пациенти, неотговорили на лечението (NR, N= 46) не се наблюдаваше статистически значима разлика в стойностите на скоровите системи 6 месеца след лечението спрямо изходните стойности (виж фиг. 27)

### **GAMAGEN/ NEW GAMAGEN:**

По отношение на двата сора за неинвазивна оценка на фиброобразуването, се установи значим спад в края на лечението (т.е. положителна динамика в процеса на фиброобразуване). Нямаше разлика в стойностите в края на лечението и проследени 6 месеца след края на терапията и при двата сора- ефектът, който е постигнат в края на лечението се задържа проследен 6 месеца след това.

**Фигура 29.** Динамика на стойностите на GAMAGEN и M-GAMAGEN:

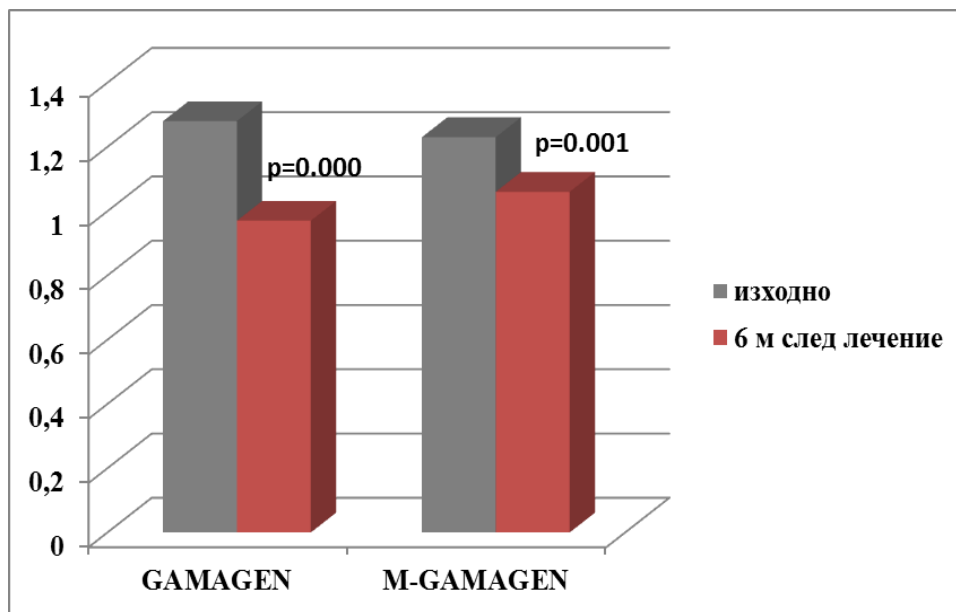


Таблица 53. Коефициенти на корелация GAMAGEN – M GAMAGEN:

КОРЕЛАЦИИ	M-GAMAGEN ИЗХОДНО	M-GAMAGEN КРАЙ НА ЛЕЧЕНИЕ	M-GAMAGEN 6 М СЛЕД ЛЕЧЕНИЕ
GAMAGEN ИЗХОДНО	<b>r= 0.974</b> p= 0.000 N= 98	r= 0.692 p= 0.000 N= 67	r= 0.701 p= 0.000 N= 72
GAMAGEN КРАЙ НА ЛЕЧЕНИЕ	r= 0.695 p= 0.000 N= 67	<b>r= 0.967</b> p= 0.000 N= 67	r= 0.729 p= 0.000 N= 62
GAMAGEN 6 М СЛЕД ЛЕЧЕНИЕ	r= 0.710 p= 0.000 N= 72	r= 0.741 p= 0.000 N= 62	<b>r= 0.985</b> p= 0.000 N= 72

Установи се статистически значима положителна корелация в стойностите на двата сора през всички периоди на проследяване.

В резултат на изразените взаимовръзки между двата индекса за неивазивна оценка на чернодробната фиброгенеза, можем да заключим, че:

*Модифицираният GAMAGEN е достатъчно добър, поради високата му корелация с класическия, но е много по-удобен и лесен за приложение в ежедневно клинична практика, защото не изисква определяне на IgG, а се базира на прости рутинни показатели.*

#### 4.2. Скорове при терапия с Омбитазвир/АВТ-450/ Ритонавир + Дазабувир ± Рибавирин:

На таблицата по-долу са показани медианите на различните скорове проследени по време на терапията с безинтерферонов режим:

**Таблица 54. Медиани на различните скорове изходно и в края на терапията при пациентите, провели лечение с DAA's:**

<b>N=12</b>	<b>median</b>
<b>GAMAGEN изходно</b>	2.13
<b>GAMAGEN край на терапия</b>	1.03
<b>GAMAGEN 6 м след терапия</b>	1.2
<b>M-GAMAGEN изходно</b>	1.74
<b>M-GAMAGEN край на терапия</b>	1.05
<b>M-GAMAGEN 6 м след терапия</b>	1.2
<b>GUCI изходно</b>	1.21
<b>GUCI край на терапия</b>	0.46
<b>GUCI 6 м след терапия</b>	0.42
<b>FCI изходно</b>	0.25
<b>FCI край на терапия</b>	0.19
<b>FCI 6 м след терапия</b>	0.1
<b>APRI изходно</b>	1.17
<b>APRI край на терапия</b>	0.41

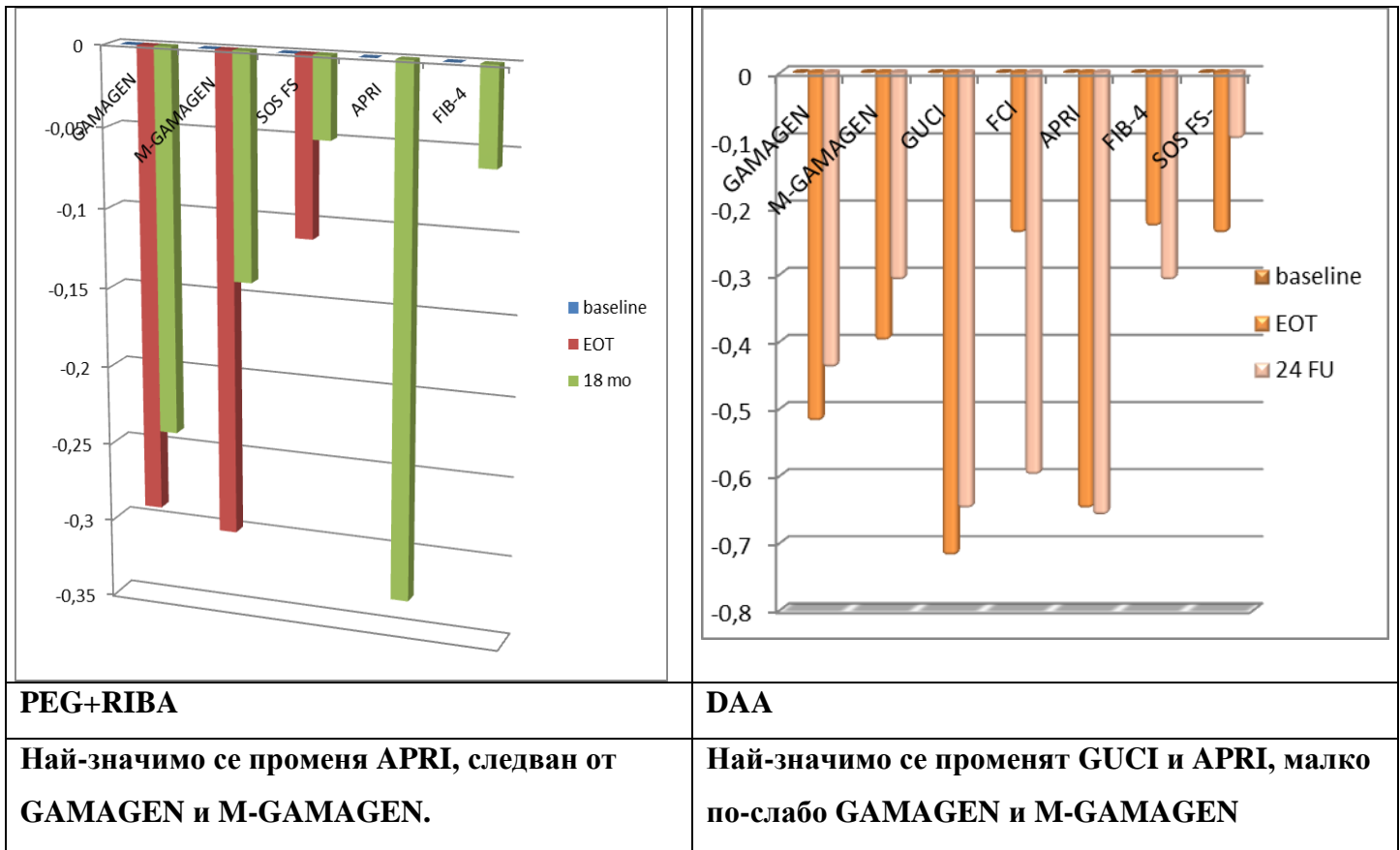
При безинтерфероновата терапия отново се потвърди високата корелационна зависимост между GAMAGEN и M-GAMAGEN. Също толкова силна беше зависимостта между GUCI и APRI, така също и FIB-4 с GUCI и APRI. На следващата таблица са посочени тези корелации:

**Таблица 55. Корелации между скоровете при пациенти, провели безинтерферонова терапия (само значими):**

<b>Корелация</b>	<b>12 седмица</b>
<b>GAMAGEN – M GAMAGEN</b>	<b>r= 0.900; p= 0.000</b>
<b>GUCI – APRI</b>	<b>r= 0.958; p= 0.000</b>
<b>GUCI – FIB-4</b>	r= 0.685; p= 0.014
<b>APRI – FIB-4</b>	r= 0.811; p= 0.001

Съпоставихме промените в скоровете системи при двата терапевтични режима като % спад спрямо изходно. На таблицата по-долу са представени тези промени:

**Фигура 30.** Промени в скоровите системи за неинвазивна оценка на фиброзата и фиброгенезата при двата терапевтични режима:



## VI.ДИСКУСИЯ:

Определянето на тежестта на чернодробната болест чрез чернодробна биопсия дава представа за моментното състояние на черния дроб. От друга страна, определянето на HCV RNA дава представа за това, дали увреждащият за черния дроб фактор-вирусът на хепатит С, се размножава или неговото реплициране е подтиснато. Въпросът, какво става със самото чернодробно увреждане по време на лечение и след него, може най-успешно да бъде решен именно чрез неинвазивни методи за оценката му.

В настоящото проучване установихме, че мъжете размножават вирус С в по-голяма степен и средната им възраст в нашия случай е  $43,7 \pm 13,8$ , за разлика от жените, при които средната възраст е  $48 \pm 11,1$ . Вероятно тази разлика се дължи на различията в телесното тегло- за съответната възраст за мъжете отговаря средно тегло 82 кг, а за жените 69 кг. Също така е известно, че двата пола имат разлика и в телесната повърхност- за мъжете средно тя е  $1,9 \text{ м}^2$ , а за жените- $1,6 \text{ м}^2$ .

Още през 1978г. З. Кръстев (5) съпоставя серумните нива на индивидуални белтъци (албумин, алфа-1 АТ, алфа-1 кисел гликопротеин, хаптоглобин, церулоплазмин, холинестераза, А2МГ, трансферин, имуноглобулини) при различни стадии на чернодробно заболяване-чернодробна стеатоза, ХПХ, ХАХ, чернодробна цироза без асцит, чернодробна цироза с асцит. Авторът установява, че средните стойности на белтъците намаляват със задълбочаването на чернодробното увреждане, а показателите на острата фаза се повишават при хроничните чернодробни заболявания. Въпреки различните методики използвани през 70-те години и сега, резултатите са аналогични – с изключение на най-тежко болните-чернодробна цироза с асцит, каквито няма в актуалната студия.

Установихме, че с нарастване на възрастта на пациентите с хронична HCV инфекция значително нараства А2МГ  $r = 0.618$ , както и активността на болестта  $r = 0.368$  хистологично предимно до 40-50 години и много по-слабо фиброзата  $r = 0.248$  и то след 40 години и обратно, почти незначително намалява нивото на хаптоглобина  $r = -0.222$ ;  $p = 0.011$  и то предимно до 40 години. Доказа се сигнификантна положителна корелация между изходните нива на А2МГ и възрастта на пациентите (Spearman= 0.618;  $p = 0.000$ ) и по-слабо изразени корелации на възрастта с изходните хаптоглобин ( $r = -0.222$ ;  $p = 0.011$ ) и степента на хистологична активност (**0.368**) и фиброзата (0.248).

Средната стойност на А2МГ нараства успоредно на активността и фиброзата в черния дроб. Обратно на това, стойностите на хаптоглобина бяха по-високи при пациенти с по-лека активност на чернодробната болест. Единствено при изходните стойности на серумния албумин се доказва значима разлика в зависимост от хистологичната активност, т.е. пациенти, които имаха по-ниска степен на активност на чернодробната болест (А1) имаха по-високи средни стойности на албумина ( $p=0.002$ ). Според данните на З. Кръстев, при серумните нива на хаптоглобина се наблюдава тенденция за по-високи от контролните средни стойности най-вече при чернодробна стеатоза и хронични хепатити и снижение от ЧС към чернодробна цироза с асцит, поради увреждане на възможностите за синтез. При серумния албумин е аналогично-снижаване на средните стойности със задълбочаване на чернодробното увреждане (5). Концентрацията на хаптоглобин беше в слаба негативна корелация с оценката на хистологичната активност (Spearman= -0.199;  $p=0.026$ ), както се очаква и съответно на проучванията на О. Косева (4). Васц и сътр. при проучвания при пациенти с хроничен хепатит С, установяват, че серумните нива на хаптоглобина са значително по-ниски при пациентите с HCV инфекция, отколкото при здравите контроли. Отбелязват и негативна корелация на хаптоглобина с индекса на хистологична активност на Knodell ( $p<0.001$ ) (24).

Преди лечението вирусите корелира с прохепсидина (Spearman=0,475;  $p=0,002$ ), като не се намери разлика в нивата на прохепсидина между различните HCV генотипове. Разлика между генотиповете имаше по отношение на стойностите на А2МГ, HCV RNA и албумина преди лечение. Пациентите с генотип 1 имаха значимо по висока изходна вирусемия и А2МГ, а тези с генотип 3- по-висок изходен серумен албумин. Тези промени вероятно се дължат на това, че пациентите с генотип 3 обикновено са по-млади хора и имат по-лека чернодробна болест.

Установи се и статистически значима разлика в изходните нива на серумния прохепсидин при двата пола в полза на мъжете ( $p=0.017$ ), което може да се дължи на установеното различие между тях в серумните нива на HCV RNA (3 668 541±8 150 840- за мъже и 2 460 381±7 915 245- за жени).

Комбинирането на различни показатели се използва за неинвазивна оценка на активността и фиброзата в черния дроб, като основната част от тези системи различава с голяма вероятност цирозата на черния дроб. Динамиката на стойностите на тези тестове не е достатъчно добре оценена и то в различните популации. Засега като

стандарт се приема FIBROTEST, но не може да се очаква, че за една година лечение ще се промени фиброзата в черния дроб. Може да намали активността, но не и фиброзата. От друга страна вероятно спира и фиброобразуването. По тази причина ние решихме да използваме повечето от утвърдените тестове, както и единствения в литературата доказан тест за фиброгенеза, а не за фиброза, който е предложението от О. Косева и сътр. GAMAGEN (4). Ние опростихме теста, като заменихме имуноглобулин G с глобулините като разлика между общия белтък и албумина и установихме изключително висока корелация между модифицирания и оригиналния GAMAGEN:  **$r=0.974$ ,  $p=0.000$** . Сравнихме двете вариации на теста GAMAGEN с различни белтъци, хистологичната картина по METAVIR и другите използвани при хроничен хепатит C тестове. Той корелираше слабо с хистологичната картина, което приемаме за добър знак – корелационен коефициент около 0.300, но много добре с тестовете **APRI, FIB-4 и SOS FS и в малко по-малка степен с албумина, глобулините и алфа-2 макроглобулина.**

Наблюдава се много висока корелация на А2МГ (положителна) и албумина (отрицателна) със степента на хистологична активност, в по-малка степен, но също значима беше корелацията на IgG и хаптоглобин (отрицателна) с хистологичната активност. Стадият на чернодробна фиброза корелираше в най-голяма степен отново с А2МГ, по-слабо-с албумин (отрицателна) и IgG. Цитолитичните ензими показва значима положителна корелация с А2МГ и отрицателна-с хаптоглобин, а тромбоцитите-значима отрицателна зависимост с А2МГ и положителна-с хаптоглобин, които са още едно потвърждение на ключовата роля на А2МГ и хаптоглобина при чернодробното увреждане.

По отношение на скорвете за неинвазивна оценка на фиброзата APRI, FIB-4 и SOS FS при пациентите, провели лечение с интерферон и рибавирин, отново в най-голяма степен те корелираха със стойностите на А2МГ и хаптоглобина ( $p=0.000$ ), така също и с IgG. В по-малка степен, но също значимо, скорвите корелираха с нивата на албумина и глобулините. Установихме силно изразени изходни зависимости на GAMAGEN и M-GAMAGEN с албумина, глобулините, алфа-2 макроглобулина, APRI, FIB-4 и SOS FS. Също така и при двата индекса имаше умерено изразени зависимости с хаптоглобина (отрицателна), хистологичната активност и фиброзата. M-GAMAGEN корелираше умерено с изходните стойности на TNF-а.

Сериозни връзки установихме между GAMAGEN, SOS FS, APRI и FIB-4, както и между FIB-4 и APRI и SOS FS. По същия начин корелираха стойностите на **GAMAGEN и M GAMAGEN с GUCI, FCI, както и GUCI с FCI, APRI, FIB-4 и FCI с APRI** теста (при безинтерферонов режим на лечение).

#### **ЛЕЧЕНИЕ:**

Лечението със стандартна комбинация пегилиран интерферон и рибавирин бе ефективно в близо 60% от случаите, което съвпада с данните на Мечков, Кръстев и сътр. (7) и е малко по-ниско от данните на К. Антонов-81% (1), докато безинтерфероновата терапия е ефективна при всички болни. Страничен ефект от лечението е наблюдавания спад в нивата на тромбоцитите, хемоглобина (68, 135), албумина, хаптоглобина, който също може е чувствителен на действието на интерферона и рибавирин и съответно да бъде супресиран. Ефект от терапията е спадът/ нормализирането на трансминазите, покачването на тромбоцитите, албумина и др. Когато в хода на лечение има спад на А2МГ, това се смята за подобрене на чернодробната болест. 6 месеца след лечение изчезват страничните ефекти на интерферона върху хаптоглобина, албумина и тромбоцитите, но ефектът върху А2МГ и скоровите системи, в които той участва, би трябвало да се запазят.

В групата пациенти с отговор на лечението (R) спадът в стойностите на хемоглобина спрямо изходните беше значим на 3-тия месец ( $p=0.000$ ) и в края на терапията ( $p=0.000$ ), както и в групата пациенти без отговор на лечението (NR) спадът в стойностите на хемоглобина на 3-тия месец и в края на терапията спрямо изходните стойности беше аналогичен на пациентите с отговор (R). Изходно хемоглобинът корелираше в умерена степен единствено с изходните нива на прохепсидина; слаба корелация имаше на 3-ти месец от лечението с хаптоглобина, значителна корелация имаше в края на лечението с нивата на албумина ( $r= 0.522$ ;  $p=0.000$ ), както и 6 месеца след лечение, но в умерена степен ( $r= 0.306$ ;  $p=0.004$ ).

При пациентите по време на интерферонова терапия, които ние проследихме, спадът на хемоглобина на 3-тия месец не би могъл да предскаже постигането на терапевтичен ефект, поради еднаквите промени при двете групи пациенти, разделени в зависимост от отговора на терапията.

Промените в нивата на тромбоцитите по време на лечение бяха аналогични и при двете групи в зависимост от отговора на терапията-значим спад на трети месец и в края на лечението. Проследени 6 месеца след лечението, стойностите при R се

възстановяват до изходното ниво, а при NR- се покачват дори над изходните. Очевидно е, че в дадената ситуация и промените в стойностите на тромбоцитите по време на лечение не биха могли да бъдат белег за разграничаване на отговорили от неотговорили на терапията.

Изходно тромбоцитите корелираха положително в умерена степен с хаптоглобина, на третия месец-много слабо отново с хаптоглобина. В края на лечението имаше изразена корелация с hsCRP, а 6 месеца след лечението-тромбоцитите корелираха с умерена степен отново хаптоглобина. Вероятно тези връзки на тромбоцитите с хаптоглобина се дължат на факта, че и двата показателя отразяват в известна степен активността на чернодробната болест и същевременно и двата показателя търпят еднопосочна промяна вследствие на действието на медикаментите.

По отношение на скоровите системи за неинвазивна оценка на фиброзата и фиброгенезата, то очаквано имаше висока обратна корелация на тромбоцитите със скоровите, в чиито състав участват-APRI и FIB-4 (изходно съответно  $r = -0.555$  и  $p = 0.637$ ); (6 месеца след лечение съответно  $r = -0.535$  и  $r = -0.603$ ).

Установи се слабо изразена положителна корелация между нивата на хаптоглобина на третия месец и тези на хемоглобина на третия месец (Spearman= 0.290;  $p=0.002$ ). Hung и сътр. (100) описват корелация между трайният вирусологичен отговор (SVR) и периода на изразена анемия по време на комбинирана антивирусна терапия ( $r=0.774$ ,  $p=0.003$ ), особено при пациенти с генотип 1 ( $r=0.960$ ,  $p<0.001$ ) (14). В настоящото проучване промените в нивата на хаптоглобина не можеха да бъдат ориентир за степента на хемолизата предизвикана от рибавирин. Екстравазалната хемолиза, причинена от рибавирин е най-вероятното обяснение.

**В хода на лечението значимо спаднаха серумните нива на A2MG и хаптоглобина.** Шест месеца след спиране на терапията обаче, нивата на A2MG и хаптоглобина отново се покачиха и достигнаха дори по-високи нива от изходните, включително и при успешно отговорилите на терапията. Покачването на хаптоглобина след лечение е положителен феномен- т.е. освен, че се възстановява синтеза му, би могло да бъде белег на регресия на фиброзата. Известно е, че интерферонът има супресивен ефект върху протеиновия синтез (90), което може да се види и от промените в албуминовите нива. В опит за обяснение на спада на A2MG след лечение, отделихме пациентите с най-тежка чернодробна болест. Оказа се, че при пациентите с напреднала фиброза или оформена вече цироза (F3 и F4) има покачване след приключване на

лечението, т.е. вероятно е необходимо повече време за да претърпи фиброзата обратно развитие при тези пациенти. Подобна тенденция имаше обаче и при по-леките стадии на чернодробна болест. Съответно може да се постави въпроса дали това е временен rebound феномен или белег за връщане на активността на болестта и може да се заключи, че няма зависимост между тежестта на чернодробното заболяване и промените в нивата на А2МГ и хаптоглобина след лечение. Предполагаме, че отпадането на супресивния ефект на интерферона и рибавирина, е по-вероятното обяснение за промените.

Открихме оскъдни данни в литературата за промените в нивата на показателите на възпалението при HCV инфекция по време на лечение и почти никакви за проследяването им след лечение, самостоятелно извън индексите за неивазивна оценка на фиброзата, с които да съпоставим нашите данни. Oguz et al. (152) проследяват промените на CRP, А2МГ, албумин и още няколко параметъра по време на лечение с pegIFN+ribavirin за 48 седмици. Авторите показват значим спад в нивата на CRP, феритин, А1АГ (алфа-1 кисел гликопротеин) и А2МГ на 4-та седмица спрямо изходно ( $p<0.05$ ), като нивата на А2МГ започват да се възстановяват още в края на лечението. Отговорилите и неотговорилите на терапията имали незначимо, но забележимо различни нива на CRP, феритин, трансферин, А1АГ, А2МГ и АЛАТ и при двете групи изходно и на 12-та седмица. По отношение на стойностите на А2МГ, спред данните на З. Кръстев (5) - той е най-маркантно повишен при активна чернодробна болест и цироза, но при намалена синтетична функция и спад на албумина, може да се наблюдават и по-ниски стойности, което е още една предпоставка да се мисли, че намалението му може да се дължи например на подтисната продукция от интерферона. Поради тази причина има разлики в нивата по време и след терапия. В литературата има много малко данни в това отношение, ето защо ние препоръчваме изследване на показателите динамично-преди лечение, в хода на лечение, в края на терапията и при проследяване след лечение.

Единствено при пациенти със степен на активност А3 на чернодробната болест се наблюдаваше сигнификантен спад на А2МГ в края на лечението ( $p=0.023$ ). Такъв спад нямаше при пациенти с А1 и А2. Лечението с интерферон и рибавирин води до намаление на серумния албумин още от третия месец на лечение, като то е най-изразено в края на лечението, а 6 месеца след спирането му, серумния албумин се повишава по отношение на края на лечението и не достига нивата си преди терапия. Обратен ефект се наблюдава при безинтерферонов режим – албуминът се повишава

още на третия месец, който в тези случаи е бил край на лечението и продължава да се повишава 3 месеца след преустановяване на ефективното лечение.

Елиминацията на вирусната инфекция в края на лечението (група В) бе съпроводена и със спад в стойностите на прохепсидина. В групата на пациентите с ETR се очерта статистически значим спад в стойностите на прохепсидина на третия месец и в края на лечението спрямо изходните стойности ( $p=0,023$ ;  $p=0,005$ ), по-изразен за генотип 1 и по-бавен за генотип 3. Тези данни се потвърждават и от Jaroszewicz и сътр. (106), които наблюдават значително намаление на прохепсидина по време на успешна антивирусна терапия. Може да се предположи, че размножаването на HCV генотип 1 влияе на хепсидиновата експресия. При инфекция с HCV генотип 3 тази зависимост не е така ясна. Промените в нивата на прохепсидин при пациентите NR не достигнаха статистическа значимост по време на лечението с интерферон и рибавирин ( $p=0.260$ ;  $0.225$ ), което се потвърждава и от данните на Jaroszewicz и сътр. Отново в потвърждение на техните резултати, ние установихме при HCV генотип 1 положителна корелация между изходните стойности на HCV RNA и прохепсидина (Spearman=0.445;  $p=0.009$ ). Подобна корелация не беше установена при пациентите с генотип 3. Това би могло да има прогностично значение по отношение на ефекта от лечението.

Нивата на ИгГ спаднаха значимо едва 6 месеца след края на лечението, а тези на CRP и TNF-a- не се промениха до края на лечението. Вероятно техните нива трябва да се проследят и след лечението в следващи проучвания, за да се оцени значението им за ефекта от лечението и промените в чернодробното увреждане.

**Промените започват от третия месец и са по-изразени или значими при тези, които ще имат отговор на терапията.**

**Скорове :** Разделени по групи на пациенти, които са отговорили на терапията и неотговорили, в групата на успешно лекуваните пациенти (R, N= 75) се наблюдава статистически значим спад в стойностите на скоровите системи за неинвазивна оценка на фиброза и фиброгенеза. Това е най-значимо за GAMAGEN, M-GAMAGEN и APRI. Изключителната корелационна връзка между оригиналния и модифицирания GAMAGEN се запази по време на лечението –  $r > 0.960$ , което подкрепя абсолютно взаимозаменяемостта на двата варианта. *Модифицираният GAMAGEN е достатъчно добър, поради високата му корелация с класическия, но е много по-удобен и лесен за приложение в ежедневноата кл. практика, защото не изисква определяне на IgG, а се базира на прости рутинни показатели.*

Намаление на стойностите на отделните скорове наблюдавахме и при краткотрайното лечение с Омбитазвир/АВТ-450/ Ритонавир + Дазабувир ± Рибавирин. Какво се очертава – по време на лечението с двойна терапия с най-голям процент спадат APRI и GAMAGEN, а при директно действащите агенти – APRI и GUCI, който съвсем малко се различава от APRI (допълнително е включен INR), както и двата варианта на GAMAGEN. Естествено и в двата вида лечение, по-мудни са SOS FS и FIB-4, тъй като те отразяват фиброзата. Това наблюдение освен, че потвърди някои от нашите знания до момента, ни обогати с други и ни подпомага да сме убедени, когато съобщаваме на пациента, че не само вече няма вирус, но и като цяло има подобрение на чернодробната болест от лечението на хроничния хепатит. Всички тези тестове са създадени за да определят степента на цирозата и за съжаление те разграничават добре само напредналата филроза от ненапредналата. Единствено GAMAGEN е разработен на базата на хистологични белези за фиброобразуване. Малко са опитите за проследяване на тестовете по време на лечението. Тъй като повечето са за фиброза, те трудно биха се променили. Тестовете които разграничават цирозата на базата на тромбоцити се променят само, защото се променят чернодробните ензими, но тромбоцитите не могат да се променят бързо. Това са основната първо- да опростим GAMAGEN и второ- да направим проследяване на панела от утвърдени тестове. Съответно това очертава картината на разликите интерферон – безинтерференова терапия. Предлагаме да се използват 2 вида тестове – такива които да съдържат биологично различни компоненти. Едните, съдържащи синтезираните от черния дроб белтъци и другите, включващи демографските показатели, тромбоцитен брой, цитолитични ензими и др., с цел оценка на чернодробната болест преди лечение и подобрението ѝ след лечение. Посочените тестове са прости и достъпни за всяка лаборатория. Много автори са съпоставяли неинвазивни скорови системи помежду им и с чернодробна хистология преди лечение, като съобщават по-добра прогностична стойност за чернодробна фиброза на един или друг показател (37, 47, 64, 193). Не открихме данни за проследяване на промените на скорови системи преди и след лечение при хепатит С.

В заключение може да се каже, че това е единственото проучване при болни с хроничен хепатит С, в което са проследени изходно, в хода на лечение и след него промените на белтъците, участващи в чернодробното възпаление и на скоровите системи за неинвазивна оценка на фиброзата и фиброгенезата, както и сложните взаимовръзки между тях.

## **VII. ИЗВОДИ:**

1. По време на лечение с IFN и Ribavirin се променят показателите на възпалителния отговор (вкл. прохепсидин).
2. При HCV генотип 1 и вирусологичен отговор се понижават прохепсидиновите нива, което може да предскаже постигането на вирусологичен отговор
3. Противовъзпалителният ефект на лечението с IFN и Ribavirin започва от 3-ти месец. Промените в хаптоглобиновите нива по време на терапия не могат да предсказват вирусологичен отговор. Алфа 2 макроглобулинът е най-удобния серумен биомаркер за оценка на активността, фиброгенезата и фиброзата при хроничен хепатит С
4. Обединяването на показателите на възпалението в скорови системи дава възможност за лесно проследяване на терапевтичния ефект върху чернодробната болест. При пациенти с траен вирусологичен (SVR), се наблюдават значими промени с скоровите системи.
5. Модифицираният GAMAGEN е достатъчно добър и много лесен за приложение в клиничната практика, защото се базира на прости рутинни показатели
6. Най-изразена промяна се наблюдава в стойностите на GAMAGEN, M-GAMAGEN и APRI при лечение с интерферон и на GUCI и APRI, следвани от FIB-4 при безинтерферонов режим. Най-слаби са промените във SOS-FS, тъй като отразява фиброзата. По-изразени промени има в индекса GAMAGEN, който е специфичен за фиброобразуването.
7. Промените в чернодробната функция трябва да се оценяват не само по време на лечение, но и 6 месеца след спирането му, тъй като медикаментите сами за себе си променят някои от показателите. Разумно е да се използват поне две скорови системи- едната, която включва индивидуални белтъци, а другата чернодробни ензими и тромбоцити.

### **VIII. ПРИНОСИ:**

1. За първи път са проследени промените в нивата на различни биомаркери и цитокини в хода на противовирусно лечение при български пациенти с хепатит С и е направен опит за изясняване на ролята им за чернодробното увреждане
2. За първи път са проследени промените в различни скорови системи за неинвазивна оценка на фиброзата и фиброгенезата в хода на противовирусно лечение при български пациенти с хроничен хепатит С
3. Предложена е модификация на вече валидиран скор за неинвазивна оценка на фиброгенезата, която включва по-прости и рутинно изследвани показатели
4. Установено е различие в поведението на синтезираните в черния дроб белтъци при стандартно лечение – интерферон+ рибавирин и безинтерферонон режим

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Антонов К. Хронична HCV инфекция – характеристика и особености на лечението. Дисертация за присъждане на доктор на медицинските науки-автореферат. София, 2010
2. Антонов К., Желев Д., Иванова А., Матева Л. и сътр. Влияние на стеатозата върху ефективността на лечението с пегилиран интерферон-алфа 2а и рибавирин при пациенти с хроничен хепатит С. JCM 2009: 01, стр. 21-26
3. Консенсус относно диагнозата, лечението и проследяването на болни с хронични вирусни хепатити, Българска хепатогастроентерология, 2010
4. Косева О. Серумни маркери за чернодробна фиброза и фиброгенеза. Дисертация. София, 2007
5. Кръстев З. Диспротеинемия при хронични чернодробни заболявания (индивидуални серумни белтъци) . Дисертация. София, 1978
6. Матева Л., Антонов К., Желев Д., Алексиев А. Неалкохолна стеатоза и инсулиновата резистентност при хроничен хепатит С. JCM 2009: 02, стр. 16-22
7. Мечков Г., Кръстев З., Желев Д., Антонов К. и сътр. Ефективност на лечението с пегилиран интерферон алфа-2А (40kDa) (PEGASYS) в комбинация с Ribavirin при болни с хроничен С хепатит. Българска Хепатогастроентерология, 2003:3, стр. 10-14
8. Пенкова М. Сравнителна оценка на претоварване с желязо при пациенти с хронични чернодробни заболявания. Автореферат на Докторска дисертация. София, 2013
9. Пенкова М. Сравнителна оценка на претоварване с желязо при пациенти с хронични чернодробни заболявания. Medical Biology Studies, Volume III (68-73)
10. Abd Elmonem E, Tharwa E, Farag MA, Fawzy A, El Shinnawy SF and Suliman S. Hepcidin mRNA level as a parameter of disease progression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst. 2009; 21: 333-342
11. Abdel Motaleb M, El-Dafrawy M, Zakaria M. Study of some non-invasive markers of fibrosis with histopathological correlation with chronic liver diseases. Liver International; 2006, 26(1):37

12. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, et al. Hepascore – an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C Infection. *Clin Chem* 2005;51:1867-73
13. Aguilera V. and Berenguer M.. Hepatitis C and fibrosis. *REV ESP ENFERM DIG* (Madrid) Vol. 96. N.º 6, pp. 402-414, 2004
14. Ahmad W., Ijaz B., Javed T. F., et al. A comparison of four indexes in chronic HCV: Development of new fibrosis – cirrhosis index (FCI). *BMC Gastroenterology* 2011, 11:44
15. Ahmed L., Salama H., Ahmed R., et al. Evaluation of Fibrosis Sero-Markers versus Liver Biopsy in Egyptian Patients with Hepatitis C and/or NASH and/or Schistosomiasis. *Parasitologists United Journal*. Vol. 2, No. 1 , 2009, 67 – 76
16. Alberti A, Boccato S, Ferrari A, Benbegnu L, Pontisso P, Noventa F, et al. Outcome of initially mild chronic hepatitis C *Hepatology* 2001;34: 225A
17. Ali G. and Masoud M. S. Bone Marrow Cells Ameliorate Liver Fibrosis and Express Albumin after Transplantation in CCl<sub>4</sub> -Induced Fibrotic Liver. *Saudi J Gastroenterol*. 2012 Jul-Aug; 18(4): 263–267
18. Allison A. C. and Rees W., “The binding of haemoglobin by plasma proteins (haptoglobins). It’s bearing on the “renal threshold ” for haemoglobin and the aetiology of haemoglobinuria,” *British Medical Journal*, vol. 2, no. 5054, pp. 1137–1143, 1957
19. Angulo, P, Keach, J.C, Batts, K.P, and Lindor, K.D. Independent predictors of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999; 30: 1356–1362
20. Arain S. A., Jamal Q, Omair A. "Liverscore" is predictive of both liver fibrosis and activity in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2011 ; 17(41): 4607-4613
21. Armstrong PB, et al. (1999) Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev Comp Immunol*. 23(4-5): 375-90
22. Arroyo V., Abradales J. G., Gines P., et al. Treatment of liver diseases, 2009 [27-35; 485-495]
23. Atta M, Cabral M, Santos G, Paraná R, Atta A. Inflammation biomarkers in chronic hepatitis C: association with liver histopathology, HCV genotype, and cryoglobulinemia. *Inflamm Res*. 2012 Oct;61(10):1101-1106

24. Bacq Y, Schillio Y, Brechot J-F, De Muret A, Dubois F, Metman E-H. Decrease of haptoglobin serum level in patients with chronic viral hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 1993; **17**: 364–69
25. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209–18
26. Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37: 493-503
27. Battegay, E. J., Raines, E. W., Seifert, R. A., Bowen-Pope, D. F., Ross, R. (1990) TGF- $\beta$  induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 63, 515–524
28. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1409–1417
29. Becker S, Quay J, Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol* 1991;147:4307-4312
30. Bedossa P, Poynard T, The French METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;24:289–293
31. Beinker NK, Voigt MD, Arendse M, Smith J, Stander IA, Kirsch RE. Threshold effect of liver iron content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. *J. Hepatol.* 1996; 25: 633-638
32. Bekri S, Gual P, Anty R, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006; 131:788–796
33. Bird GLA, Sheron N, Goka AKJ, Alexander GJ, Williams RS. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med* 1990;112:917-920
34. Bissell DM. Assessing fibrosis without a liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology* 2004;127:1847-9
35. Border, W. A., Noble, N. A. (1994) Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 331, 1286–1292
36. Borth, W. (1992)  $\alpha$ 2-Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J.* 6, 3345–3353
37. Boursier J., Brochard C., Bertrais S., et al. Combination of Blood Tests for Significant Fibrosis and Cirrhosis Improves the Assessment of Liver-Prognosis in Chronic Hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(2):178-188

38. Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet.* 1982;12:189-261. 453-454
39. Brunt E. M. Grading and Staging the Histopathological Lesions of Chronic Hepatitis: The Knodell Histology Activity Index and Beyond. *HEPATOLOGY* January 2000, 241-246
40. Buckley RH. Humoral immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; **40**:13–24
41. Cadranel JF, Mathurin P. Prothrombin index decrease: a useful and reliable marker of extensive fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1057–9
42. Caldwell, S.H, Oelsner, D.H, Iezzoni, J.C, et al. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology.* 1999; 29: 664–669
43. Cales P, Oberti F, Michalak S, et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005;42:1373-81
44. Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, et al. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat Med* 2004;10:429-34
45. Casaril M, Stanzial AM, Tognella P, Pantalena M, Capra F, Colombari R, Corrocher R. Role of iron load on fibrogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterol.* 2000; 47: 220-225
46. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., Heinrich, P. C. (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 242, 237–239
47. Castéra L., Vergnio J.I, Foucher J. et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;128:343–350 [Abstract]
48. Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;62(suppl):S3-S10
49. Che W., Zhang B., Liu W., et al. Association between High-Sensitivity C-Reactive Protein and N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Mediators of Inflammation* Volume 2012, Article ID 730923, 6 pages

50. Clouston, A.D, Jonsson, J.R, Purdie, D.M, et al. Steatosis and chronic hepatitis C: analysis of fibrosis and stellate cell activation. *J Hepatol.* 2001; 34: 314–320
51. Corengia C., Galimberti S., Bovo G., Vergani A., Arosio C. Iron accumulation in chronic hepatitis C. Relation of Hepatic Iron Distribution, HFE Genotype, and Disease Course. *Am J Clin Pathol* 2005;124:846-853
52. Deeks E. D. Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir Plus Dasabuvir: A Review in Chronic HCV Genotype 1 Infection. *Drugs* (2015) 75:1027–1038
53. De la Mata M., Meager A., Rolando N. et al. Tumor necrosis factor production in fulminant hepatic failure: relation to aetiology and superimposed microbial infection. *Clin Exp Immunol* 1990; 82:479-484
54. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513–1520
55. Devictor D, Decimo D, Sebire G, Tardieu M, Hadchouel M. Enhanced tumor necrosis factor alpha in coronavirus but not in paracetamol-induced acute hepatic necrosis in mice. *Liver* 1992;12:205-208
56. Dhingra R, Gona P, Nam BH, D’Agostino RB, Wilson PWF, Benjamin EJ, et al. C-Reactive Protein, inflammatory conditions and cardiovascular disease risk. *Am J Med* 2007;120(12):1054–62
57. Dispenzieri A, Gertz MA, Therneau TM, Kyle RA. Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy. *Mayo Clin Proc* 2001; **76**:476–87
58. Dufour DR. Assessment of liver fibrosis: Can serum become the sample of choice? *Clin Chem* 2005;51:1763-4
59. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;60(2):392–420
60. Fallatah H. I. and Akbar H. O. Elevated serum immunoglobulin G levels in patients with chronic liver disease in comparison to patients with autoimmune hepatitis. *Libyan J Med* 2010, 5: 4857
61. Fehér J, Jakab L, Józsa L, Szilvási I, Papp G. Serum immunoglobulin and glycoprotein concentration and mesenchymal reaction in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Morphol Igazságügyi Orv Sz* 1977;17:180-186
62. Feige JJ, *et al.* (1996) Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor-beta and various cytokines. *Horm Res.* 45(3-5): 227-32
63. Feizi T. Immunoglobulins in chronic liver disease. *Gut* 1968 9: 193-198

64. Ferenci P., Aires R., Beavers K. L. et al. Predictive value of FIB-4 and APRI versus METAVIR on sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C patients. *Hepatology* (2014) 8:83–93
65. Fine, A., Goldstein, R. H. (1987) The effect of transforming growth factor- $\beta$  on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262, 3897–3902
66. Floris-Moore M, Howard AA, Lo Y, Schoenbaum EE, Arnsten JH, Klein RS. Hepatitis C infection is associated with lower lipids and high-sensitivity C-reactive protein in HIV infected men. *AIDS Patient Care STDS* 2007;21:479–491
67. Freeman AJ, Law MG, Kaldor JM, Dore GJ. Predicting progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2003;10:285–293
68. Fried M. W., Shiffman M. L., Reddy K. R., et al. Peginterferon alfa - 2a plus Ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, Vol. 347, No. 13, September 26, 2002, 975-982
69. Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol* 1997; **32**: 424–430
70. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatology* 2003;38 Suppl 1: S38-S53
71. Fontaine H, Nalpas B, Poulet B, Carnot F, Zylberberg H, Brechot C, et al. Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis C. *Hum Pathol* 2001;32:904–909
72. Fujita N., Sugimoto R., Takeo M., Urawa N., Mifuji R., Tanaka H. Hcpidin expression in the liver: Relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med* 13 (1 -2) 97-104 , January- February 2007
73. Galal G. M. , MS Muhammad E. MS., Eldeen F. EZ S., Amin N. F., Abdel-Aal A. M. Serum prohepcidin, iron and hepatic iron status in chronic hepatitis C in Egyptian patients. *JASMR*, 6(2):91-101(2011)
74. Gangadharan B., Antrobus R., Dwek R. A., and Zitzmann N. Novel Serum Biomarker Candidates for Liver Fibrosis in Hepatitis C Patients. *Clinical Chemistry* 53:10; 1792–1799) (2007)
75. Geier A., Reugels M., Weiskirchen R., Wasmuth H., Dietrich K., Siewert E. Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver International*. 2004;24(4)

76. Ghany MG, Kleiner DE, Alter HJ, Doo E, Khokhar F, Park Y, et al. Progression of fibrosis in early stages of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32: 496A
77. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokhar F, Promrat K, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:97–104
78. Ghany M. G., Strader D. B., Thomas D. L., and Seeff L. B. AASLD PRACTICE GUIDELINES - Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An Update. *HEPATOLOGY*, Vol. 49, No. 4, 2009 [1335-1374]
79. Giannini E, Mastracci L, Botta F, et al. Liver iron accumulation in chronic hepatitis C patients without HFE mutations: relationships with histological damage, viral load and genotype and alpha-glutathione S-transferase levels. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001; 13: 1355-1361
80. Giltay EJ, Fonk JC, von Blomberg BM, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJ. *In vivo* effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**:1648–57
81. Gines P., Kamath P. S., Arroyo V. Chronic liver failure. Humana press 2010. p 66
82. Girelli D, Pasino M, Goodnough J, et al. Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J. of Hepatology* 2009; 51 : 845- 852
83. Gonzàlez-Quintela A, Alende MR, Gamallo R, et al. Serum Immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in Chronic Hepatitis C. A Comparison with Non-cirrhotic Alcoholic Liver Disease. *Hepato-gastroenterology* 50(54):2121-6 · 2003
84. Gonzalez-Quintela A, Lopez-Ben S, Perez LF, Grana B, Varela M, Tome S, et al. Time-course changes of serum immunoglobulins (IgA, IgG, IgM) after liver transplantation for alcoholic cirrhosis. *Transpl Immunol* 2003;11:73–7.
85. Goodman Z. D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology* 47 (2007) 598–607-Review
86. Goodman ZD, Becker RL, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C: Evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology* 2007;45:886–894
87. Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 1995; 15:70-81
88. Goto M, Takei Y, Kawano S, Tsuji S, Fukui H, Fushimi H, Nishimura Y, et al. Tumor necrosis factor and endotoxin in the patho genesis of liver and pulmonary injuries after orthotopic liver transplantation in rat. *HEPATOLOGY* 1992; 16:487-493

89. Guillen MI, Gomez-Lechon MJ, Nakamura T, Castell JV. The hepatocyte growth factor regulates the synthesis of acute-phase proteins in human hepatocytes: divergent effect on interleukin-6-stimulated genes. *Hepatology* 1996; **23**: 1345–52
90. Gupta R., Kim S. and Taylor M. W. Suppression of ribosomal protein synthesis and protein translation factors by Peg-interferon alpha/ribavirin in HCV patients blood mononuclear cells (PBMC). *Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:54
91. Gupta S., Ahern K., Nakhl F., and Forte F. Clinical Usefulness of Haptoglobin Levels to Evaluate Hemolysis in Recently Transfused Patients. *Advances in Hematology*, Volume 2011, Article ID 389854, 4 pages
92. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; **140**: 346-355
93. Heinrich, P. C., Castell, J. V., Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265, 621–636
94. Henry JB, Nelson DA, Tomar RT, Davidsohn I. Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 17th ed. 1984; WB. Saunders Company Philadelphia. p210
95. Hepatitis C Guidance: AASLD-IDS Recommendations for Testing, Managing, and Treating Adults Infected With Hepatitis C Virus, *HEPATOLOGY*, Vol. 00, No. 00, 2015
96. Ho AS, Cheng CC, Lee SC, et al. Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *J Biomed Sci* 2010;17:58
97. Hourigan, L.F, MacDonald, G.E, Purdie, D, et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology*. 1999; 29: 1215–121
98. Huang M. L., Austin C. J. D., Sari M., et al. Hepcidin Bound to  $\alpha_2$ -Macroglobulin Reduces Ferroportin-1 Expression and Enhances Its Activity at Reducing Serum Iron Levels. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 288, NO. 35, pp. 25450–25465, August 30, 2013
99. Huang C. F., Hsieh M. Y., Yang J. F. et al., “Serum hs-CRP was correlated with treatment response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C patients,” *Hepatology International*, vol. 4, no. 3, pp. 621–627, 2010

100. Hung C.; Lee C.; Lu S.; Wang J.; Chen C.; Hu T.; Kee K. ; Chang K.; Tseng P.; Yen Y.; Changchien C. Anemia Associated With Antiviral Therapy in Chronic Hepatitis C: Incidence, Risk Factors, and Impact on Treatment Response. *Liver International*. 2006;26(9):1079-1086
101. Huo, T, Wu, J.C, Hwang, S.J et al. Factors predictive of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: a multivariate analysis in a longitudinal study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12: 687–693
102. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069–75
103. Itkonen, O., Stenman, U.-H., Parkkinen, J., et al. (2012) Binding of hepcidin to plasma proteins. *Clin. Chem.* 58, 1158–1160
104. Jacobson IM, Brown RS Jr, Freilich B et al. Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* 2007; **46**: 971-981
105. Jaroszewicz J, Rogalska M, Fisiak R. Serum Prohepcidin reflects the degree of liver function impairment in liver cirrhosis. *Biomarkers* 2008; 13:478-485
106. Jaroszewicz J., Rogalska M., Flisiak I., Flisiak R. Successful antiviral therapy is associated with a decrease of serum prohepcidin in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2010 April 14; 16(14): 1747-1752
107. Kalabay L, Nemesanszky E, Csepregi A, et al. Paradoxical alteration of acute-phase protein levels in patients with chronic hepatitis C treated with IFN-alpha2b. *Int Immunol* 2004;16:51–54
108. Kawser CA, Iredale JP, Winwood PJ, Arthur MJ. Rat hepatic stellate cell expression of alpha-2-macroglobulin is a feature of cellular activation: implications for matrix remodelling in hepatic fibrosis. *Clin Sci* 1998; 95: 179–86
109. Khan KN, Yatsuhasi H. Effect of alcohol consumption on the progression of hepatitis C virus infection and risks of hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Alcohol Alcohol* 2000; 35: 286-95
110. Kleeberg UR. Pathophysiologie und Diagnostik hämolytischer Anämien. *Dtsch med Wschr* 1975;100:1400

111. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431–435
112. Kovacs DM. (2000) alpha2-macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 35(4): 473-9
113. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988). "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF". *Cell* **53** (1): 45–53
114. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann NY Acad Sci* 1982;389:39–48
115. Langlois M. R. and Delanghe JR R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistiy* 42:10; 1589-1600 (1996)
116. Lapinski TW. Activation of acute phase proteins in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha 2a. *Pol Merkur Lekarski* 2001;10:138-142
117. Larrea E, Garcia N, Qian C, Civeira MP, Prieto J (1996) Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 23:210–217
118. Lathem W., "The renal excretion of hemoglobin: regulatory mechanisms and the differential excretion of free and proteinbound hemoglobin," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 38, no. 4, pp. 652–658, 1959
119. Lathem W. and Worley W. E., "The distribution of extracorporeal hemoglobin in circulating plasma," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 38, no. 3, pp. 474–483, 1959
120. Laurel C. B. and Nyman M., "Studies on serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin," *Blood*, vol. 12, no. 6, pp. 493–506, 1957
121. Lee H., Jeong H., Park S. et al. Fusion protein of retinol-binding protein and albumin domain III reduces liver fibrosis. *EMBO Mol Med* (2015) 7: 819–830
122. Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo RP, Lindsay K, Bodenheimer HC, et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C. A multicenter comparative study with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993; 104: 595-603

123. Louagie H. K., Brower J. T., Delanghe J. R., De Buyzere M. L., Leroux-Roels G. G., Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C, *J of Hepatology*, 1996, 25, Issue 1, P 10-14
124. Lynch JR, Blessing R, White WD et al. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004;35:57-63
125. Maddison SE, Relmen CB. Normative values of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion: a review. *Clin Chem* 1976; **22**:594–601
126. Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, et al. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *J Hepatol* 1999; 30: 984-9
127. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1):9–16
128. Martinelli AI, Ramalho LN, Zucoloto S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 19: 91-98
129. Martinet, Y., Rom, W. N., Grotendorst, G. R., Martin, G. R., Crystal, R. G. (1987) Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 317, 202–209
130. Martínez Hernández A, Amenta PS. Morphology, localization and origin of the hepatic extracellular matrix. In: Zem MA, Reid LM, eds. *Extracellular matrix, chemistry, biology and pathobiology with emphasis on the liver*. New York: M Dekker, 1993. p. 201-54
131. Marusawa, H., M. Hijikata, T. Chiba, and K. Shimotohno. 1999. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kB activation. *J. Virol.* 73:4713–4720
132. Maruyama S, Hirayama C, Horie Y, Yorozu K, Maeda K, Inoue M, et al. Serum immunoglobulins in patients with chronic hepatitis C: a surrogate marker of disease severity and treatment outcome. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 493\_8
133. Mauss, Berg, Rockstroh, Sarrazin, Wedemeyer. *HEPATOLOGY - A Clinical Textbook*. Edition 2012 /326/
134. McBride JD, Cooper MA. A high sensitivity assay for the inflammatory marker C-Reactive protein employing acoustic biosensing. *J Nanobiotechnol* 2008;6:5

135. McHutchison J. G., Gordon S. C. et al. Interferon alfa - 2b alone or in combination with Ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*, 1998, Volume 339 Number 21,1485-1492
136. Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. *Am. J. Gastroenterol.* 2004; 99: 286-291
137. Mizuhara H, O’Neille E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, Satoh S, et al. T cell activation associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factor and protection by interleuckin-6. *J Exp Med* 1994;179:1529-1537
138. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 1997; **181**: 257–66
139. Murray R. K., *Harper’s Illustrated Biochemistry*, 27th edition, 2006
140. Muto Y., Takei Y., Kawano S. et al. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988;9:72-74
141. Nagakawa J, Hishinuma I., Hirota K. et al. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice. *Gastroenterology* 1990;99:758-765
142. Nagashima M, Kudo M, Chung H, Ishikawa E, Hagiwara S, Nakatani T, Dote K. Regulatory failure of serum prohepcidin levels in patients with hepatitis C. *Hepatology Research* 2006; 36: 288-293
143. Nascimento MM, Bruchfeld A, Suliman ME, et al. Effect of hepatitis C serology on C-reactive protein in a cohort of Brazilian hemodialysis patients. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:783–788
144. Nathan, C. , Sporn, M. (1991) Cytokines in context. *J. Cell Biol.* 113, 981–986
145. Natsume M., Tsuji H., Akihisa Harada et al. Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* 66: 601–608; 1999
146. Naveau, S, Giraud, V, Borotto, E, et al. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology.* 1997; 25: 108–111
147. Naveau S., Poynard T. , Benattar C., Bedossa P., Chaput J. C. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. *Digestive Diseases and Sciences.* Vol. 39, No 11 (1994), pp. 2426-2432

148. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-2463
149. Nelson DR, Lim HL, Marousis CG, Fang JW, Davis GL, Shen L, Urdea MS, Kolberg JA, Lau JY. Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection. *Digestive Diseases and Sciences* 1997, Volume 42, Issue 12, pp 2487-2494 [Abstract]
150. Nokta M, Matzke D, Jennings M, Schlick E, Nadler PI, Pollard R. In vivo administration of tumor necrosis factor-alpha is associated with antiviral activity in human peripheral mononuclear cells. *Soc Exp Biol Med* 1991;197:144-149
151. Nyberg A, Berne B, Nordlinder H, Busch C, Eriksson U, Loof L, et al. Impaired release of vitamin A from liver in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:136-41
152. Oguz A, Atay AE, Tas A, Seven G, Koruk M. Predictive role of acute phase reactants in the response to therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gut Liver*. 2013; 7(1): 82-8
153. Ohnaka K, Kono S, Inoguchi T, Yin G, Morita M, Adachi M, et al. Inverse associations of serum bilirubin with high sensitivity C-reactive protein, glycated hemoglobin, and prevalence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Japanese men and women. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;88(1): 103-10
154. Olmez O, Gurel S, and Yilmaz Y. Plasma Prohepcidin levels in patients with chronic viral hepatitis: relationship with liver fibrosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2010; 22: 461-465
155. Ong, J.P, Younossi, Z.M, Speer, C, et al. Chronic hepatitis C and superimposed non-alcoholic fatty liver disease. *Liver*. 2001; 21: 266-271
156. Ono K, Sata M, Murashima S, Fukuizumi K, Suzuki H, Tanikawa K. Biological responses to administered interferon in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1560-1563
157. Ortalık Z, Toyran A, Sen S, Mart Kömürcü SZ, Güvener E. Evaluation of serum IgG, IgA and IgM levels as indicators of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Mikrobiyol Bul.* 2011 Apr;45(2):296-305

158. Paradis V, Mathurin P, Charlotte F, Vidaud M, Poynard T, Hoang C, et al. Histological features predictive of fibrosis in chronic hepatitis C infection. *J Clin Pathol* 1996; 49: 1-7.
159. Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806-7810
160. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935-42
161. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107(3):499-511
162. Penkova M., Gulubova M., Ananiev J., Ivanova R., Mateva L. Role of Hepcidin in the Regulation of Iron Metabolism in Patients with Chronic Liver Diseases. *International Journal of Business, Humanities and Technology* Vol. 2 No. 7; December 2012, 89-94
163. Peslova, G., Petrak, J., Kuzelova, K., et al. (2009) Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to  $\alpha$  2-macroglobulin in blood. *Blood* 113, 6225–6236
164. Pessione F, Degós F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, Martinot-Peignoux M, et al. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27: 1717-22
165. Pietrangelo A. Inherited metabolic disease of the liver. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009 May;25(3):209-14
166. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811-7819
167. Piperno A, Vergani A, Malosio I, Parma L, Fossati L, Ricci A, et al. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. *Hepatology* 1998; 28: 1105-9

168. Popović-Dragonjić L., Jovanović M., Vrbić M. et al. High sensitivity C-reactive protein as prediction factor of disease progression in patients with chronic hepatitis C and mild liver steatosis. *Acta Medica Medianae* 2010, Vol.49(3), pp14-18
169. Poynard T, Bedossa P, Opolon P, for the OBSVIRC, CLINIVIRC and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 825-32;
170. Poynard T Ratziu V, Benmanov Y, et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C:detection and significance. *Semin Liv Dis* 2000;20:47-55
171. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risks factors of liver progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34: 730-9
172. Ragab S.M., Safan M.A. and Badr E.A. Study of Serum Haptoglobin Level and its Relation to Erythropoietic Activity in Beta Thalassemia Children. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015, 7(1): e2015019
173. Ratziu, V, Bonyhay, L, Di Martino, V, et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*. 2002; 35: 1485–1493
174. Ratziu V, Munteanu M, Charlotte F, Bonyhay L, Poynard T; LIDO Study Group. Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2003 Dec;39(6):1049-55
175. Ray, R. B., K. Meyer, and R. Ray. 1996. Suppression of apoptosis cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 226:176–182
176. Ray, R. B., K. Meyer, and R. Ray. 2000. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology* 271:197–204
177. Ray, R. B., and R. Ray. 2001. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol. Lett.* 202:149–156
178. Ray, R. B., K. Meyer, R. Steele, A. Shrivastava, B. B. Aggarwal, and R. Ray. 1998. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.* 273:2256–2259
179. Reingold J, Wanke C, Kotler D, et al. Association of HIV infection and HIV/HCV coinfection with Creactive protein levels: the fat redistribution and metabolic change in HIV infection (FRAM) study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;48:142–148

180. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391–397
181. Roberts, A. B., Sporn, M. (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-b (TGF-b). *Growth Factors* 8, 1–9
182. Rossi E., Adams L. A., Bulsara M., Jeffrey G. P.. Assessing Liver Fibrosis with Serum Marker Models. *Clin Biochem Rev* Vol 28 February 2007; 10p
183. Rossi E, Adams L, Prins A, et al. Validation of the FibroTest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 2003;49:450-4
184. Rubin BY. TNF and viruses: multiple interrelationships. In: Aggarwal BB., Vilcek J., eds. *Tumor necrosis factors*. New York: Dekker, 1992:331-340
185. Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004; 53: 451-455
186. Saito K., Meyer K., Warner R. et al. Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Apoptosis by a Protective Effect Involving Cellular FLICE Inhibitory Protein. *JOURNAL OF VIROLOGY*, May 2006, p. 4372–4379 Vol. 80, No. 9
187. Sari, M. A., Chatterjee, S., Artaud, I., et al. (2011) Preparation and evaluation of fluorescent and biotinylated hepcidin analogs as hepcidin agonists. *Am. J. Hematol.* 86, E14
188. Salvesen, G. S., Sayers, C. A., and Barrett, A. J. (1981) Further characterization of the covalent linking reaction of  $\alpha$ -2-macroglobulin. *Biochem. J.* 195, 453–461
189. Savendahl L, Underwood LE. Fasting increases serum total cholesterol, LDL cholesterol and apolipoprotein B in healthy, nonobese humans. *J Nutr* 1999;129:2005–8
190. Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM. The pathology of hepatitis C. *Hepatology* 1992; 15: 567-71
191. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: Collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 1-10.

192. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;10(Suppl 1):S59–67
193. Sebastiani G., Halfon P., Castera L. et al. Comparison of three algorithms of non-invasive markers of fibrosis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 92–104
194. Shen, Y., and T. E. Shenk. 1995. Viruses and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:105–111
195. Sheron N., Lau J., Daniels H. et al. Increased production of tumor necrosis factor alpha in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1991;12:251-255
196. Shiha G., Zalata K. Ishak *versus* METAVIR: Terminology, Convertibility and Correlation with Laboratory Changes in Chronic Hepatitis C. *Liver Biopsy* 2011 (155-170)
197. Shima M, Nakao K, Kato Y, Nakata K, Ishii N, Nagataki S, et al. Comparative study of C-reactive protein in patients with chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *Tohoku J Exp Med* 1996;178:287-97
198. Silva I., Perez R., Oliveira P., Cantagalo M., Dantas E., Sisti C. Iron overload in patients with chronic hepatitis C virus infection: clinical and histological study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Feb;20(2):243-8
199. Silverman, J.F, O'Brien, K.F, Long, S, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol.* 1990; 85: 1349–1355
200. Silverman LN, Christenson RH. Protein. In: Burtis CA, Ashwood ER; eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* Philadelphia, PA: Saunders.1999;494-497)
201. Skowron' ski M., Zozulin' ska-Zio' łkiewicz D., Juszczak J., Michalski W., and Wierusz-Wysocka B., “C-reactive protein and chronic hepatitis C virus infection in diabetic patients,” *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, vol. 120, no. 12, pp. 491–496, 2010
202. Sottrup-Jensen, L. (1989)  $\alpha$ -Macroglobulins: Structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* 264, 11539–11542
203. Sprugel, K. H., McPherson, J. M., Clowes, A.W., Ross, R. (1987) Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chamber. *Am. J. Pathol.* 129, 601–613

204. Sterling R. K., Lissen E., Clumeck N. et al. for the APRICOT Clinical Investigators. Development of a Simple Noninvasive Index to Predict Significant Fibrosis in Patients With HIV/HCV Coinfection. *HEPATOLOGY* 2006;43:1317-1325
205. Stoica G, Macarie E, Michiu V, Stoica RC. Biologic variation of human immunoglobulin concentration. I. Sex–age specific effects on serum levels of IgG, IgA, IgM and IgD. *Med Interne* 1980; **18**:323–32
206. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N (2010). "A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease". *Biol Psychiatry* **68** (10): 930–941
207. Swinkels D., Wetzels J. Heparin: A new tool in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* (2008) 23: 2450–2453
208. Tan T. H., Crawford D. H. G., Franklin M. E. et al. The serum hepcidin:ferritin ratio is a potential biomarker for cirrhosis. *Liver International* ISSN 1478-3223, 2012
209. Tanaka S, Okamoto Y, Yamazaki M, Mitani N, Nakajima Y, Fukui H. Significance of hyperglobulinemia in severe chronic liver diseases \_ with special reference to the correlation between serum globulin/IgG level and ICG clearance. *Hepatology* 2007; 54: 2301\_5
210. Tang P, Klostergaard J (1996). "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer". *Biochemistry* 35 (25): 8216–25
211. Thampanitchawong P. and Piratvisuth T. Liver biopsy: complications and risk factors, *WJG*, 1999 August; 5(4):301-304
212. Theurl I., Zoller H., Obrist P., Datz C., Bachman F., Elliot R., Weiss G. Iron regulates hepatitis C virus translation via stimulation of expression of translation initiation factor 3. *J Infect Dis.* (2004) 190 (4): 819-825
213. Thompson D, Pepys MB, Wood SP (Feb 1999). "The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine". *Structure* 7 (2): 169–77
214. Thursz M. Genetic susceptibility in chronic viral hepatitis. *Antivir Res* 2001; 52: 113-6
215. Tiggelman AM, Boers W, Moorman AF, et al. Localization of alpha 2-macroglobulin protein and messenger RNA in rat liver fibrosis: evidence for the

- synthesis of alpha 2-macroglobulin within *Schistosoma mansoni* egg granulomas. *Hepatology* 1996; 23:1260-1267
216. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Noelchen B, Judmaier G, and Huber Ch. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-274
217. Tillmann HL, Chen DF, Trautwein C, Kliem V, Grundey A, Berning- Haag A, et al. Low frequency of HLA-DRB1\*11 in hepatitis C virus induced end stage liver disease. *Gut* 2001; 48: 714-8
218. Tsui JI, Whooley MA, Monto A, Seal K, Tien PC, Shlipak M. Association of hepatitis C virus seropositivity with inflammatory markers and heart failure in persons with coronary heart disease: data from the Heart and Soul study. *J Card Fail* 2009;15:451-456
219. Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; **5**: 226-30
220. Valenti L., Pulixi E., Arosio P. et al. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica* 2007; 92:1037-1042
221. Van Vlierberghe H., Delanghe J. R., De Vos M., Leroux-Roel G. Factors influencing ribavirin-induced hemolysis. *J of Hepatology*, Volume 34, Issue 6, Pages 911-916, June 2001
222. Volanakis JE. Human C-Reactive protein: expression, structure and function. *Mol Immunol* 2001; 38(2): 189-97
223. Wai C., Greenson J. K., Fontana R. J. et al. A Simple Noninvasive Index Can Predict Both Significant Fibrosis and Cirrhosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *HEPATOLOGY*, Vol. 38, No. 2, 2003, 518-526
224. Watt K, Uhanova J, Gong Y, Kaita K, Doucette K, Pettigrew N, et al. Serum immunoglobulins predict the extent of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2004; 11: 251\_6
225. Westin J. et al. A non-invasive fibrosis score predicts treatment outcome in chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol.* 2008
226. White, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10:1-15

227. Wick M, Pinggera W, Lehmann P. Iron Metabolism. Diagnosis and Therapy of Anemias, 3rd ed. Vienna/New York: Springer-Verlag 1996
228. Wiley TE, Mc Carthy M, Breidi L, Mc Carthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998; 28: 805-9
229. Wong GHW, Krowka JF, Stites DP, Goeddel DV. In vitro antiradicals human immunodeficiency virus activities of tumor necrosis faccells tor-alpha and interferon-gamma. *J Immunol* 1988;140:120-125
230. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 1334-1340
231. Yelken B, Gorgulu N, Caliskan Y, et al. Association between chronic hepatitis C infection and coronary flow reserve in dialysis patients with failed renal allografts. *Transplant Proc* 2009;41:1519–1523
232. Yoshioka K., Kakumu S., Arao M. et al. Tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. *HEPATOLOGY* 1989; 10:769-773
233. Yovita H, Djumhana A, Abdurachman SA, Saketi JR. Correlation between anthropometrics measurements, prealbumin level and transferin serum with Child-Pugh classification in evaluating nutritional status of liver cirrhosis patient. *Acta Med Indones* 2004; 36:197–201.
234. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972–978
235. Zhang A, Sun H., Sun W., Ye Y., Wang X. Proteomic identification network analysis of haptoglobin as a key regulator associated with liver fibrosis. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 Feb;169(3):832-46)