

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ

УМБАЛ „СВ. ИВАН РИЛСКИ”

**ПРОМЯНА НА БИОМАРКЕРИ ПРИ ЛЕЧЕНИЕТО НА ВИРУСНИ
ХЕПАТИТИ**

Дисертационен труд

за присъждане на научно-образователна степен „Доктор” на

д-р Нина Стоянова Николова

Научна специалност - Гастроентерология

Научен ръководител

проф. д-р Людмила Матева Владимирова, дмн

София, 2015

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	2 стр.
Въведение.....	5 стр.
Литературен обзор.....	8 стр.
Цел и задачи.....	34 стр.
Материал и методи.....	35 стр.
Резултати	44 стр.
Обсъждане.....	93 стр.
Изводи.....	106 стр.
Приноси.....	108 стр.
Литература.....	109 стр.

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

АЛАТ– аланин аминотрасфераза

АСАТ – аспартат аминотрасфераза

ГРГ – горна референтна граница

ИР – инсулинова резистентност

ИТМ – индекс на телесна маса

ИФН - интерферон

ПЧР – първичен чернодробен рак

ТВО – траен вирусологичен отговор

ЧЦ – чернодробна цирроза

ХХВ – хроничен хепатит В

ХХС – хроничен хепатит С

На латиница:

ALT - аланин аминотрасфераза

Anti-HAV IgG – антитела от тип G срещу вируса на хепатит А

Anti-HBcor-total – антитела (IgM и IgG) към сърцевия (core) антиген на вируса на хепатит В

Anti-HCV – антитела към вируса на хепатит С

AST – аспартат аминотрасфераза

ELISA - ензим-свързан имуносорбентен анализ

EVR – early virological response (ранен вирусологичен отговор)

HBsAg – повърхностен антиген на вируса на хепатит В

HBV DNA – хепатит В вирусна ДНК

HCV RNA – хепатит С вирусна РНК

HDL - Липопротеини с висока плътност

HDL – х- HDL- холестерол

Hgb - хемоглобин

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

HOMA-IR – Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance

IFN – интерферон

IP-10 (CXCL10) - C-X-C мотив хемокин 10 (CXCL10), Interferon gamma-induced protein 10 – интерферон – гама индуциран протеин 10

GGT – гама-глутамил трансфераза

LDL - Липопротеини с ниска плътност

LDL-x – LDL- холестерол

Max – максимална стойност

Min – минимална стойност

NUC – нуклеоз(т)идни аналози

PCR - Polymerase chain reaction- Полимеразна верижна реакция

Peg-IFN – пегилиран интерферон

PLT – тромбоцити

RVR – rapid virological response (бърз вирусологичен отговор)

SVR – sustane virological response (траен вирусологичен отговор)

Sx - стандартно отклонение

VLDL – липопротеини с много ниска плътност

WBC - левкоцити

II. ВЪВЕДЕНИЕ

Въпреки увеличаващия се брой налични антивирусни агенти, лечението на хроничните вирусни инфекции В и С все още е проблем, особено при напреднали чернодробни заболявания.

Балансът между вродения и придобития имунен отговор е от основно значение не само за прогресията на чернодробното заболяване, но също така и за ликвидиране на хроничната вирусна инфекция. Много цитокини са намесени в този баланс. Проучването на динамиката на различните цитокини в хода на противовирусната терапия, е важно за разбиране ролята на имунната система и за възможностите за подобрене на терапевтичния подход.

През последните години се изследва значението на цитокин IP-10 (интерферон – гама стимулиран пептид 10) като предиктор на вирусологичния отговор при интерферон-базираните режими за лечение на хроничната HCV инфекция. Данните за български пациенти са малко. Недостатъчни са данните за ролята на IP-10 при HBV инфекцията.

Проучва се и значението на други фактори за терапевтичния отговор при лечението на хроничната С инфекция. Сред тях са полиморфизмът на IL28B гена, витамин D, В 12, фолиевата киселина и редица други метаболитни промени, свързани с чернодробните заболявания.

Последните няколко години се въведе количествено определяне на серумния HBsAg, с оглед търсене на достъпен и неинвазивен сурогатен маркер, който да корелира добре с cccHBV DNA (ковалентно свързана циклична HBV DNA) в черния дроб. Много са проучванията за ролята му в естествения ход на хроничната В инфекция, както и по време на лечение. Въведоха се т.нар. „спиращи правила”, при интерфероновото (IFN)

лечение на хроничния хепатит В. Те обаче все още не са залегли в международните и съответно в нашите препоръки за поведение. Малко са данните за българската популация. Малко са и данните за динамиката му при лечението с нуклеоз(т)идни аналози (NUC).

Малко изследвания има при т.нар. трудни за лечение с интерферон HBeAg – негативни пациенти с генотип D HBV инфекция, която е основно преобладаващата сред българската популация. Удължаването на стандартната IFN- терапия (повече от 48 седмици), при тези болни, проследявайки нивата на количествения HBsAg, води до повишаване процента на трайния вирусологичен отговор (ТВО) и на загуба на HBsAg.

През последните години нови лекарства за лечение на хроничната вирусна инфекция В се разработват и са базирани на имуномодулацията (като терапевтични ваксини, TLR (toll-like рецепторни) агонисти. Но все още не са навлезли при лечението на хроничната HBV инфекция. Може би оптимизиране на проследяването и поведението с наличните на този етап терапевтични средства, е реалната възможност за подобрене на резултатите.

Резултатите от комбинираното приложение на Peg-IFN и NUC са ограничени и противоречиви.

Оскъдни са данните за самостоятелното приложение на Рибавирин, особено при трудни за лечение пациенти с хронична С вирусна инфекция и влиянието му върху имунната система и в частност нивата на IP-10.

Хроничните вирусни хепатити В и С все още съставляват значителен процент от хроничните чернодробни заболявания и основна причина за чернодробна цироза с нейните усложнения и първичен чернодробен рак. Изучаването и натрупването на нови и допълнителни данни за различни

биомаркери, при утвърдени и експериментални противовирусни режими, и характеризирани на най-значимите от практическа гледна точка, са актуален проблем в съвременната хепатогастроентерология.

III. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Епидемиология и социална значимост на ХХВ и ХХС.

Хроничните вирусни хепатити – HCV и HBV са със съществено епидемиологично и социално значение. По данни на СЗО над 180 млн. души в света са инфектирани с HCV (125, 15) и около 400 млн. души с HBV (24,13). Честотата на HCV инфекцията у нас е около 1,2%, т.е. заразени са над 80 000 души (141, 5), а за HBV инфекцията – 5 % от българското население (5).

Всяка година 3-4 милиона са новозаразени с вируса на хепатит С. Вирусът на хепатит С се предава най-често по кръвен път. Половият и вертикалният път са редки, а в 30-40% от случаите начинът на заразяване остава неизвестен. Рисков контингент са венозните наркомани, хемофилиците, болните на хемодиализа, както и работещите в сферата на здравеопазването (125,15). Вирусът на хепатит В е 100 пъти по-инфекциозен от HIV. Основният път на трансмисия е вертикалният – от майка на дете при раждането. Вирусът се намира в кръвта и други телесни течности, затова човек може да се зарази по и по полов и кръвен път (24,125). Голямата част от тях дори не подозират това, поради безсимптомното протичане на болестта и липса на клинични прояви и оплаквания (141).

При по-голямата част от случаите (до 80%) HCV инфекцията хронифицира, докато хронична HBV инфекция се развива средно при 5-10% от инфектираните възрастни пациенти (158,5). Между 20% и 50% от пациентите с хроничен хепатит С развиват цирроза за 10-20 г. при видимо добро здраве през годините (24). Хепатоцелуларен карцином възниква в 3% от болните с HCV цирроза годишно (159,24). При повече от 90% от случаите на ПЧР, се установяват анти – HBcor-total – антитела в серума

(45,148,28). При пациенти с хроничен хепатит В, годишния риск е 0.02% до 0.2% при неактивни носители на HBsAg, 0.1% до 1,0% от хората с хроничен хепатит без цироза и 2,2% до 3,2% при пациенти с цироза. Загуба на откриваем вирус с антивирусна терапия намалява риска от ПЧР, но не го елиминира (108). Около 1 милион смъртни случая годишно се дължат на хепатит вирусна инфекция. Заедно, вируса на хепатит В (HBV) и хепатит С (HCV) са водеща причина за рак на черния дроб в света (78 процента от случаите) (43). Декомпенсацията на чернодробната болест и първичният чернодробен рак са свързани с ниска преживяемост (13,15,46,47).

Всичко това, както и високата цена на противовирусното лечение определят голямото социално значение на проблема.

2. Имунитет и ХХВ и ХХС

Клиничното протичане на чернодробната В и С вирусна инфекции, както и изходът от лечението зависят от способността на макроорганизма да индуцира хуморален и клетъчно медиран отговор. Важна роля в защитните механизми при вирусни инфекции имат цитокините.

HBV-специфични CD4 и CD8 Т – като количество и функция са много по-добре представени при пациентите, които изчистват HBV инфекцията, отколкото при пациенти с хронична инфекция. Способността за производство на анти-вирусни цитокини (IFN- γ и TNF- α) води до HBV клирънс от заразените хепатоцити без значителна директна неспецифична цитотоксична активност. Приносът на В-клетките и антителата също са важни в HBV контрола. Изчистването на HBV е свързано с производството на специфични антитела, и серум с високи нива на анти-вирусни антитела (специфичен за вирусната обвивка) може да контролира HBV инфекция (23).

Хроничната вирусна инфекция променя количествения и функционален профил на вирус-специфичния имунитет. Детайлни функционални изследвания, съсредоточени главно върху анализа на CD8 Т-клетки показват, че по време на продължаваща вирусна инфекция същите губят способността си за лизиране, пролиферация и производство на различни цитокини (TNF-алфа и IL-2), и само частично се поддържа възможността за производство на IFN-гама. HBV-специфични CD8 + Т клетки, открити по време на хронична инфекция често показват сходни дефекти (26,120,110,172).

По време на остра HCV инфекция, в повечето индивиди, може да се установи силен Т-клетъчен имунен отговор (40). Такъв имунен отговор се поддържа при тези случаи, при които инфекцията спонтанно се изчиства. Докато при персистираща HCV инфекция е установено, че HCV-специфичните клетъчни имунни реакции като цяло са слаби. Правдоподобно е тогава, че комбинираната терапия (Peg-IFN и Рибавирин) води до дългосрочен вирусен контрол чрез засилване HCV специфичния Т-клетъчен отговор. В момента няма единно мнение по отношение на ролята, която HCV-специфични Т клетки играят в предизвикване на траен вирусологичен отговор на лечението. Последните проучвания показват, че пролиферативния капацитет или сила на HCV-специфични CD8 и CD4 Т-клетки преди лечението са важни (146). Други изследователи предполагат, че имунния отговор индуциран по време на лечението корелира с ТВО (78,41). Други проучвания не са показали връзка (10). Изследванията на Т-клетъчния отговор по време на успешно лечение на остра HCV инфекция показват спад в HCV-специфичния Т-клетъчен отговор, въпреки много високата ефективност на лечението на този етап на инфекцията, което предполага, че може би Т-клетъчно присъствие не е необходимо за постигане на ТВО (10,49).

3. Стандартно лечение на ХХС

Понастоящем стандартното лечение на пациентите с хроничен хепатит С включва пегилиран интерферон-алфа и рибавирин, включително и според Националния консенсус за лечение на пациенти с хроничен хепатит С. С този вид терапия се постига траен терапевтичен ефект само при около 65% от пациентите, инфектирани с HCV генотип 1 (67). Този генотип е доминиращ в нашата страна (> 85%). Честотата на терапевтичния отговор е по-висока (80%) сред болните с генотип 2 и 3 (67).

Отговор при лечение със стандартна двойна терапия:

- Бърз вирусологичен отговор - неустановима HCV RNA на седмица 4-та от начало на лечението
- Ранен вирусологичен отговор - спадане на HCV РНК нивото на 12 седмица от лечението, с по-повече от 2 log спрямо изходното
- Пълен ранен вирусологичен отговор - неустановима HCV RNA на седмица 12-та от начало на лечението
- Траен вирусологичен отговор - неустановима HCV RNA 6 месеца след края на лечението
- Липса на отговор – на 12 седмица от лечението не се отчита спад с ≥ 2 log спрямо изходното ниво.
- Рецидив – неустановима HCV RNA в края на лечението и поява на времения при последващо проследяване (6 месеца след лечение) (38,5).

Антивирусният ефект на интерферон-алфа се изразява в подтискане проникването на вируса в клетката и инхибиране синтезата на РНК. Имуномодулиращият ефект се изразява в подтискане на НК клетките и макрофагите. Въздействието върху Т-клетките е индиректно, чрез стимулиране антигените на главния комплекс на тъканна съвместимост (МСН). МСН се свързва с вирусния пептид, а този пептид се свързва с Т-

клетъчния рецептор. Цитототоксичните Т-лимфоцити (CTL) чрез α TNF и FAS лиганди предизвикват апоптоза (програмирана клетъчна смърт) (79). Ribavirin е нуклеозиден аналог на гуанозина. Все още пълният механизъм на противовирусния му ефект срещу HCV не е напълно известен. Предполага се, че инхибирайки ензима инозинмонофосфат дехидрогеназа, той намалява гуанозин трифосфата – субстрат при репликацията на вируса. Медикаментът инхибира mRNA и подтиска функциите на РНК полимеразата (42,61).

Рибавиринът, в сравнение с интерферона е с по-голямо значение за постигане на терапевтичен ефект. Ефектът от монотерапията с интерферон при болни с генотип 1 HCV-инфекция е едва 10%. Такъв е и българският опит (1). Добавянето на рибавирин към интерфероновото лечение при пациентите с генотип 1 е свързано с постигане на траен вирусологичен отговор в около 65% от пациентите. Ключов момент за успеха на лечението е прилагането на адекватна доза рибавирин. Трайният вирусологичен отговор намалява, ако се използва 80% от дозата на рибавирин (54,67).

Рибавирин-трифосфатът, който се натрупва в еритроцитите в концентрация, многократно по-висока от плазмената, причинява хемолитична анемия. Анемията възниква между 2-рата и 4-тата седмица от лечението, но е възможно да се изяви и след еднократна доза, както и по-късно в хода на терапията (156). Стойностите на хемоглобина спадат средно с $4 \pm 1,5$ g/l в 53% от лекуваните, но сигнификантна анемия развиват до 27% от болните. Проучванията показват връзка между наличието на ранен спад на хемоглобина в хода на лечението и постигането на траен терапевтичен отговор (164,167). Това на практика е реална възможност за индивидуализиране на лечението и повишаване на неговата ефективност

при конкретния пациент, чрез мониториране и прилагане на оптимална доза рибавирин.

4. Предиктивни фактори на терапевтичния отговор при стандартна двойна терапия за ХХС. Ролята на различни биомаркери.

Освен HCV генотипа са познати и други фактори, предопределящи благоприятен терапевтичен резултат. По-добре проучени от тях са: възраст на пациента, наличие на метаболитен синдром и инсулинова резистентност, подлежаща цироза или тежка чернодробна фиброза, претоварване с желязо (16,127,157).

Освен изброените параметри напоследък се обсъжда и значението на други предиктори на терапевтичния отговор, които са обект на нарастващ изследователски интерес. Сред тях са полиморфизмът на IL28B гена, нивата на IP-10, витамин D и B 12, и фолиевата киселина (179,153,11,71,106, 72).

Клиничното протичане и изходът от лечението зависят не само от генетичната предиспозиция и типа на вируса, но и от способността на макроорганизма да индуцира хуморален и клетъчно медиран отговор. Важна роля в защитните механизми при вирусни инфекции имат цитокините (119).

Полиморфизъм на IL28B гена

Ролята на имунната система в изчистването на вирусната HCV инфекция, е причината за търсене на вариации в гените, участващи в имунния отговор свързан с това.

След цялостното проучване на човешкия геном сдружение, се установява единичен нуклеотиден полиморфизъм (rs12979860) от 3 килобази на IL28B гена в хромозома 19q13. Той кодира тип III интерферон IFN-λ3

(интерферон ламбда). Възможни са три генотипа С/С, Т/Т и С/Т. С/С генотипа се асоциира с повече от два пъти по-голям процент (в зависимост от етноса) на отговор при лечение на HCV със стандартна двойна терапия, в сравнение с Т/Т генотипа (58). С/С генотипът се свързва и със спонтанното изчисване на вируса (169).

Интерфероните тип III включват три члена - IFN- λ 1, IFN- λ 2 и IFN λ 3- и гените, кодиращи тези молекули се намират в хромозома 19q13. Те са структурно свързани със суперсемејство цитокини IL-10 (интерлевкин-10), но функционално имат характеристики сходни с интерфероните тип I (IFN-alpha и IFN-beta). Те се индуцират при вирусни инфекции, чрез сигнализиране на пътя JAK-STAT и проявяват антивирусна активност ин витро (86). IFN- λ 1 показва дозо- и времезависимо HCV инхибиране, индуцира увеличение в нива на интерферон-стимулирани гени, и засилва антивирусния ефект на IFN-alpha. Възможно е, че IFN- λ 3 работи чрез подобен механизъм. Ин витро, резултатите показват мощен анти-вирусен ефект (122).

IP-10 (Интерферон гама индуциран протеин 10)

Интерферон гама индуцираният протеин 10 (Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) е проучван през последните години като предиктор на терапевтичния отговор при HCV инфекция (19,51,44). IP-10 е 8,7 кДа протеин (хемокин), който при човека се кодира от CXCL10 гена. Отделя се от ендотелни клетки, активирани Т-клетки (стимулирайки Th1 пътя т.е клетъчния имунитет) и хепатоцитите по време HCV инфекция. Увеличените нива на IP-10 при HCV моноинфекция корелират с чернодробното възпаление и предсказват липсата на отговор на антивирусната терапия (182). Reiberger T. et al. проследяват IP-10 нивата изходно и 24 часа след първа апликация на интерферон при 30 пациенти с

HCV-HIV коинфекция, лекувани с пегилиран интерферон (180 мкг/седмично) и Рибавирин (800-1200 мг/дн.). При пациентите с липса на отговор или с вирусологичен рецидив се установяват значително по-високи изходни нива на IP-10, в сравнение с пациентите, които са постигнали траен вирусологичен отговор. Интерферон индуцираното покачване на IP-10 е значително по-силно при пациенти с траен вирусологичен отговор (ТВО) (153,176). Нивата на IP-10 са свързани с HCV вирусния товар, нивата на аланин аминотрансферазата (АЛАТ), активността на чернодробното възпаление и стадия на фиброза. Напредналата фиброза, високият HCV вирусен товар, налягането във вена порте и нивата на IP-10 (преди лечение) > 400 pg/ml предскават липсата на отговор към антивирусната терапия. Някои автори установяват, че изходните нива на IP-10 са предиктор на ТВО със специфичност и чувствителност 83,4 % и 92,9%, съответно. Това позволява да се различат пациентите с очаквана липса на отговор или релапс след терапията от тези с ТВО преди започване на антивирусна терапия (153,14). Това наблюдение е парадоксално, тъй като IP-10 се счита за проинфламаторна молекула, която би трябвало да улеснява миграцията на активираните Т-клетки на черния дроб, отговорни за вирусния имунитет (14).

Проучване на G. Fattovich et al. цели да определи ролята на фактори като IL28B, IP-10, коагулационния статус и инсулиновата резистентност (НОМА-IR) при прогнозиране на отговора към терапията при хроничен хепатит С. Като независими предиктори на бързия вирусологичен отговор (RVR) селектират HCV RNA <400 000 IU / ml, rs12980275 AA и IP-10, при пациенти с HCV вирусна инфекция генотип 1 и ниски изходни стойности на ГГТ - при генотип 3. Независими предиктори на ТВО са rs12980275 AA, възраст <40 години и HCV РНК <400 000 IU / ml при HCV генотип 1 пациентите и rs12980275 AA и възраст <40 години при HCV

генотип 1 пациенти без RVR. RVR е сам по себе си предиктор на ТВО в HCV генотип 1 пациенти и единственият независим предиктор на ТВО в HCV генотип 2 или генотип 3 пациенти (51). Lagging M. et al. също установяват, че високите изходни стойности на IP-10 прогнозируют по-бавния спад на HCV РНК и недобър резултат след терапия с пегилиран интерферон и рибавирин при пациенти с хроничен хепатит С (95).

Роля на серумните нива витамин Д, фолати и витамин В12, липиди при лечението на ХХС

Нивата на витамин Д, фолатите и витамин В12 са сред най-слабо проучените предиктори на терапевтичния отговор. При малка група от пациенти е установено, че добавянето на витамин Д към стандартното лечение с пегилиран интерферон и рибавирин при пациенти с генотип 1 води до повишаване на честотата на бързия вирусологичен отговор (неустановима HCV RNA на седмица 4-та от начало на лечението), на пълен ранен вирусологичен отговор (неустановима HCV RNA на седмица 12-та от начало на лечението) и траен вирусологичен отговор. Липсват достатъчно проучвания, които да потвърдят или отхвърлят тези първоначални наблюдения (11). Други скорошни проучвания показват, че ниските нива на витамин Д са свързани с по-тежка чернодробна фиброза и по-лош терапевтичен отговор. Витамин Д е потенциален имуномодулатор, който има директен ефект върху Т-клетките и антигенпредставящите клетки. Той може директно или индиректно да подобри диференциацията и активността на CD4 Т-клетките. Предполага се, че витамин Д има важна роля във вродения (естествен) имунен отговор срещу HCV. В допълнение, някои проучвания показват, че витамин Д подобрява инсулиновата чувствителност (предиктор на по-добрия терапевтичен отговор) и инхибира HCV репликацията (71).

Някои проучвания от последните години установяват връзка между серумните нива на витамин В12 и вирусологичния отговор към комбинираната терапия с пегилиран интерферон и рибавирин. Процентът на пациентите, при които има ранен вирусологичен отговор е значително по-голям при тези, при които изходните серумни нива на витамин В12 са > от 331pmol/l (106,72).

Поради недостатъчните доказателства в подкрепа на тези първоначални резултати, както и липса на изследвания при българската популация, при настоящото клинично наблюдение е предвидено изследване на нивата на витамин Д, фолиевата киселина и витамин В12.

Скорошни данни показват, че LDL медиера или поне частично повлиява rs12979860 С алела (IL28B) (53). Хепатоцитите играят съществена роля за поддържане на липидната хомеостаза в организма чрез сглобяване и секреция на VLDL. Основният компонент на VLDL е ApoB 100 (аполипопротеин В100). Връзката между HCV core (ядрен) протеина и липидните капчици е особеност на рода Hepadnaviridae в семейството Flaviviridae (150). Това се дължи на присъствието на домейн D2, характерен за рода Hepadnaviridae. Хидрофобните сегменти на D2 домейна осъществяват контакта с липидните капчици в жизнения цикъл на вируса на хепатит С, като в следствие се въвлича и NS5А протеина (неструктурен протеин). Установена е обратнопропорционална връзка между свързването на липидните капки с HCV core протеина и вирусното размножаване (150,162). Връзката с липидните капки е важна и при вирусното сглобяване в жизнения цикъл на HCV.

Huang и съавтори, използвайки пречистени NS5А-позитивни мембрани, открили, че освен вирусните неструктурни протеини, участващи в HCV репликацията (NS3, NS4В и NS5В) и вирусна РНК, тези мембрани

съдържат множество протеини участващи в липидния метаболизъм. Те доказват, че за производството на инфекциозни HCV частици, се изисква функциониращ път за производство и секреция на VLDL (74).

5. ХХС и метаболитен синдром

Хроничният хепатит С има много особености, които показват, че това заболяване не трябва да се разглежда само като вирусно, но също така и като метаболитно заболяване на черния дроб, което включва: инсулинова резистентност (IR), висока честота на стеатоза, повишена честота на нарушен глюкозен толеранс, захарен диабет тип 2, промени в липидния метаболизъм. Тези особености заедно предполагат, че хронична HCV инфекция е тясно свързана с метаболитния синдром (МС). Поради това е уместно разделянето на храничната HCV инфекция на такава със и без МС. Инсулиновата резистентност е основната характеристика на МС (62). Съществува тясна връзка между ХХС и IR, чернодробна стеатоза (50,34,17), прогресираща фиброза и по-ниският процент на траен вирусологичен отговор (51, 39).

Генотипът на вируса е основен фактор, свързан със стеатозата при HCV инфекцията. Различават се два вида чернодробна стеатоза при HCV инфекция: вирус-индуцирана стеатоза и метаболитната стеатоза. Вирус-индуцираната стеатоза е свързана с генотип 3 инфекция, като степента на стеатоза се свързва с вирусния товар (12). Антивирусна терапия води до пълно възстановяване на промените в липидите и стеатозата, но вирусологичният рецидив води до поява на отново на стеатоза (94). Многобройни проучвания идентифицираха метаболитните вътреклетъчни пътища, които медиат "вирусната" стеатоза, като основна роля в това играе HCV core протеина. Експресията на HCV core протеина води до намаляване на

активността на микрозомния триглицерид-пренасящ протеин и до намаляване размера на частиците на чернодробните VLDL (128,143). Метаболитна стеатоза възниква при HCV инфекция, различна от 3 генотип и се свързва с метаболитни фактори от страна на гостоприемника: повишен индекс на телесната маса и затлъстяване от централен тип (12). Този тип стеатоза е по-скоро не- или много малко податлива на подобрене след ерадикация на HCV инфекцията. Патогенетичните механизми на метаболитната стеатоза са инсулиновата резистентност, индуцирана чрез пряко въздействие на HCV върху сигналния път на инсулина, както и фактори от страна на гостоприемника, особено затлъстяване (62).

Инсулинова резистентност (IR). Намалената способността за транспорт на глюкозата, в отговор на инсулина, от кръвния поток в мускулите и други тъкани. Това води до хипергликемия. Бета-клетки в панкреаса впоследствие увеличат продукцията си на инсулин, което допълнително допринася за хиперинсулинемия. Инсулиновата резистентност е преддиабетна фаза, която често се наблюдава при пациенти с хронична HCV (25%) и в малък процент при други чернодробни заболявания, включително хепатит В вирус (10%) (104,141). НАСБ е една от най-важните причини за хронично чернодробно увреждане и инсулиновата резистентност представлява нейн отличителен белег. Това е системно заболяване, което не само инфектира черния дроб, но също нервната система, панкреаса, сърцето, бъбреците и мускулите (62,141). Разпространението на захарен диабет тип 2 при пациенти с хронична вирусна HCV инфекция варира между 24 и 50%. Няколко проучвания показват, че HCV инфекция води до освобождаването на тумор некрозис фактор алфа (TNF-а), TNF-alfa води до потискане на механизмите на инсулиновата сигнализация, чрез блокиране на фосфорилирането на

ключови молекули на инсулиновите рецепторни субстрати (IRS) и затруднява транспорта на глюкозата молекула през плазмената мембрана (36,73).

HCV core, NS-3 и NS-5 протеините основно участват в IR. HCV core участва в образуването на капсида, NS-3 съдържа хеликазна и протеолитична активност, NS-5A потиска интерферон-стимулираните гени, а NS-5B е РНК полимераза (125). HCV core протеина увеличава нивото на експресия на TNF-а и води до инсулинова резистентност, основно чрез хипофосфорилация на инсулин рецепторните субстрати (IRS 1 и 2) (22,138). HCV неструктурния протеин 3 (NS-3) индуцира оксидативен стрес. Директната му роля в индукцията на IR не е установена (141).

Идентифицирането на изходните предиктори на добър терапевтичен отговор е с голямо практическо значение. Това би позволило реална оптимизация на лечението чрез по-добър подбор на пациентите преди началото на противовирусната терапия, както и чрез корекция на неблагоприятните фактори преди започване на лечението.

От съществено клинично значение е и проучването на предикторите на терапевтичния отговор рано в хода на лечението. Основните такива са бързото негативиране на HCV RNA още на 1-вия месец от началото на лечението и ранен спад на хемоглобина до 3-тия месец от началото на лечението. Последното е тясно свързано с оптимизиране на дозата на рибавирин.

Въпреки напредъка в познанието за HCV инфекцията и съвременните възможности за нейната диагноза и лечение, траен терапевтичен ефект се постига в около 60-70% от случаите (при стандартна двойна терапия), а безинтерфероновите режими още не са повсеместно разпространени.

Терапевтичните резултати от стандартна двойна терапия, която все още е първи избор при пациенти, нелекувани до сега, с ненапреднала чернодробна болест, са по-неблагоприятни при болни, инфектирани с генотип 1. Реални проблеми са поява на странични ефекти и усложнения в хода на лечението. Това налага търсене на възможности за повишаване на ефекта от лечението чрез по-добър подбор на пациентите преди терапията и индивидуализиране на терапевтичната схема съобразно особеностите на конкретната клинична ситуация.

6. ХХВ, естествен ход, ссс DNA.

Въпреки увеличаването броя на наличните антивирусни агенти, лечението на HBV инфекцията все е още е проблемно (113).

Инфекцията с вируса на хепатит В води до сложни биохимични, имунологични и хистологични промени в гостоприемника. Проучвания за кинетиката на вируса са показали, че вирусното натоваарване минава през сложна поредица от етапи по време на специфичната противовирусна терапията (181). HBV ковалентно свързаната циклична ДНК (сссDNA) е критичен вътреклетъчен репликативен междинен продукт, който действа като шаблон за транскрипцията на вирусните рибонуклеинови киселини (РНК-и), имащи от своя старна роля като вирусни прегеномни РНК-и или като мРНК (матриксни РНК-и), кодиращи мултифункционалната полимераза, ядрения (core), Х и S протеините. Всички тези протеини играят решаваща роля в цикъла на размножаване на HBV (181,178).

Поради високата репликативна активност на вирусната ДНК и липса на корекция на функциите на HBV полимераза, HBV претърпява бързо мутагенеза и създава лекарствено-резистентни щамове (90,168,170). Формира се вирусен сссDNA басейн. Тъй като сссDNA HBV е източник на

нови HBV вируси и устойчива на лекарствено лечение, се смята, че тя е основната причина за HBV реактивация след спиране на анти-HBV терапия (181,101).

Ковалентно свързаната ДНК (сccDNA) се свързва с вирусното присъствие (101,102,103). Резервоарът на HBV сccDNA в ядрото на инфектираните клетки е бариера за антивирусна терапия. Преодоляването и контрола на сcc DNA нивото може да бъдат показател за ефективността на лечението (102,103,183).

Липсата на корекция функциите на вирусна полимераза е довела до появата на осем HBV генотипа, от А до Н. Генотиповете на HBV, имат различно географско разпространение, с преобладаване на генотип А в Северозападна Европа, Северна и Южна Америка, генотип В и С в Азия и генотип D в Източна Европа и в Средиземноморския басейн. Останалите генотипове са установени предимно в Западна и Южна Африка (генотип Е), в Централна и Южна Америка (генотипове F и H), а генотип G - във Франция и в САЩ (125). В България, подобно на другите Южноевропейски страни и тези от Средиземноморието, повече от половината пациенти са HBeAg-негативни и при почти 100% генотипа е D (6,93).

Естественят ход на хроничната В инфекция се определя от взаимодействието на вирусната репликация и имунния отговор на гостоприемника (126). Естественят ход на хроничната HBV инфекция може схематично да бъде разделена на 5 фази, като не протичат винаги последователно – имунотолерантна; имуно-реактивна HBe-позитивна; неактивно HBV – носителство; HBeAg- негативен хроничен хепатит В и HBsAg – негативна фаза (46). Хроничният HBeAg-негативен хепатит може да следва сероконверсията на HBeAg в anti-HBe антитела по време на

имунореактивната фаза или може да се развие след години или декади на състояние на неактивно носителство. Съществуват и HBeAg – негативни пациенти (така наречените pre-core мутанти на HBV), които са неспособни да произвеждат HBeAg (30,32,66,69).

Мониторинането на вирусния товар, HBV антигени, мутации и сссDNA нивата ще дадат цялостна информация за активността на HBV в тялото (181).

Измерването на HBV сссDNA изисква чернодробна тъкан (чернодробна биопсия) и търсенето на сурогатни серумни маркери би било по-лесно изпълнимо и достъпно в клиничната практика. За такъв маркер се проучва HBsAg – количествено определяне в серум (35).

HBsAg се произвежда в излишък и циркулира в серума на заразени с HBV лица под формата на голям брой неинфекциозни HBsAg сферични и филаментозни структури, както и като повърхностен протеин от обвивката на зрелите вирусни частици (Dane частици). Циркулиращия HBsAg съдържа всички форми на L, M и S протеини, които не могат да бъдат разграничени от HBsAg количествени и качествени тестове, (тъй като се използват антитела, насочени към епитопи в S протеина, съдържащи се и в трите форми) (65).

Според J. Levin серумните HBsAg нива корелират добре с сссDNA нивата ($P < 0.0001$) и може да се използват като неинвазивен маркер за оценка. Ниското изходно ниво на HBsAg е по-добър предиктор на добрия терапевтичен отговор, в сравнение с нивата на HBV DNA при интерференова терапия (100).

При нелекувани HBeAg-негативни пациенти серумните HBsAg нива съответстват на чернодробните, но не на нивата на сссDNA или на

чернодробната HBV DNA, навеждащи на мисълта, че те не зависят единствено от репликативния цикъл (107,112).

В естествения ход на инфекцията HBsAg нивото е най-високо в имунотолерантната фаза, започва да намалява по време на имунната фаза и бавно, но прогресивно намалява след HBeAg сероконверсията. Серумното ниво на HBsAg е най-ниско при индивиди-неактивни носители на инфекцията, но по-високо при тези, които развиват HBeAg-негативен хепатит (170).

7. Лечение на ХХВ и динамика на количествения HBsAg

Целта на лечението на хроничен хепатит В е да подобри качеството на живот и преживяемостта чрез предотвратяване прогресията на болестта до цироза, декомпенсирана цироза, краен стадий на чернодробно заболяване, хепатоцелуларен карцином и смърт. Тази цел може да бъде постигната, ако HBV репликацията може да бъде постоянно и устойчиво потисната (171). Това, че хронична HBV инфекция не може да бъде напълно ликвидирана се дължи на персистирането на cccDNA в ядрото на инфектираните хепатоцити, което може да обясни реактивирането на HBV инфекцията (32,151). Освен това, HBV геномът се интегрира в генома на гостоприемника и благоприятства онкогенезата и развитието на първичен чернодробен рак (27,148,149). Лечението трябва да осигури висока степен на вирусна супресия, което след това ще доведе до биохимична ремисия, хистологично подобрение и до предотвратяване на усложнения. Идеалната крайната цел при лечението на хроничната HBV инфекция е загубата на HBsAg, която обаче е рядко постижимо с наличните към момента анти-HBV агенти. По-реалистична цел е индуцирането на трайна или продължителен вирусологична ремисия. При HBeAg - позитивни пациенти загубата на HBeAg и сероконверсия е желана цел при лечение /серологичен отговор/ (46).

В естествения ход на хроничната HBV инфекция, спонтанното изчистване на серумния HBsAg (HBs-антиген) е рядко (0.1%-0.8% на година). Спонтанната или предизвикана от лечението загуба на HBsAg се свързва с продължителна ремисия на болестта и подобрена преживяемост (46,82,177).

Понастоящем има две различни стратегии при лечението и на HBeAg-позитивните и HBeAg-негативните пациенти с хроничен хепатит В: ограничено във времето лечение с пегилиран интерферон (PEG-IFN) и продължително лечение с нуклеоз(т)идни аналози (46). Постигане на траен вирусологичен отговор (неоткриваема HBV DNA 24 седмици след прекратяване на **интерфероновото лечение** (TBO, SVR)) е между 10-42% в зависимост от продължителността на лечение с конвенционален интерферон или с пегилиран такъв (46,68,174,109). Сероконверсията на HBsAg в тези случаи е около 10% годишно. От друга страна интерферонът е с нисък антивирусен потенциал, в сравнение с нуклеоз(т)идните аналози (NUC), съществува значителен риск от рецидив (релапс) (поява на вирусна репликация > 2000 IU/ml, 24 седмици след спиране на терапията) след спиране на терапията и е противопоказан в определени случаи (130). 48-седмичния курс с PEG-IFN е главно препоръчван за HBeAg-позитивни пациенти с най-добър шанс за анти-HBe сероконверсия. Интерфероновото лечение може също да се използва и за HBeAg-негативни пациенти, тъй като на практика е единствения вариант на лечение, който може да предостави възможност за траен вирусологичен отговор след спиране на терапията, но в по-малък процент (20-25%), в сравнение с HBe-позитивните пациенти (4,6,7,25,46,66,68,69,93,109,174,). Под вирусологичен отговор или състояние на „имунен контрол“ се разбира трайно потискане на вирусната репликация с HBV ДНК < 10 000 copies/ml

(2 000 IU/ml) и нормализиране нивата на АЛАТ в края на терапевтичния курс и 6 месеца след спирането на лечението (5,25,46).

Последните данни показват, че количественото определяне на серумното ниво на HBsAg по време на лечението с пегилиран интерферон (PEG-IFN) може да бъде полезно при прогнозиране вероятността за HBsAg сероконверсия (155,165,31). Пациентите с траен отговор на Peg-IFN лечение, показват тенденция за по-значим спад на HBsAg нивата в сравнение с неотговорилите на терапията (31, 91). Оптималните нива на HBsAg по време на лечение, предопределящи отговора към терапия с ИФН при HBeAg-позитивни пациенти са <1500 IU/ml на седмица 12 или 24 (147, 165). Липсата на каквото и да е понижаване на HBsAg, заедно със спад на HBV DNA с <2 log на 12 седмица, е предложена като „правило за спиране” при HBeAg-негативните пациенти, включително и за пациенти с HBV генотип D инфекция (155,156,165).

Нуклеоз(т)идните аналози са с висока ефикасност в HBV супресията (блокира HBV полимеразата) без директен ефект върху транскрипцията и транслацията на HBsAg. Ето защо загубата на HBsAg по време на лечението с NUC може да се случи само след продължителен период на инхибиране на вирусната репликацията при неоткриваема HBV DNA в серума и постигната HBeAg загуба (37,82). Вирусната резистентност (особено към Ламивудин) и необходимостта от дългогодишна продължителност на терапия за постигане на вирусна супресия са основните проблеми в терапията с NUC. Основният въпрос дали терапията с NUC може да бъде спряна в определен етап, остава нерешен (130,88). След прекратяване на терапията често настъпва HBV реактивация с увеличаване серумните нива на HBeAg (HBe- антиген) и HBV DNA, клинично протичаща с хепатит, чернодробна недостатъчност и дори смърт (181,160). Кръстев и съавтори показват три случая на опити за

преодтвратяване на такава реактивация на болестта след спиране на Ламивудин с помощта на интерферон и Изопринозин (inosine pranobex) (88).

При пациентите на лечение с NUC спада на HBsAg е бавен и не корелира с HBV DNA. Според Wursthorn и съавт., бърз по време на лечението /с Тенофовир/ спад на HBsAg $\geq 1 \log \text{ IU/mL}$ за една година се свързва с висок процент на последваща загуба на HBsAg /при HBe положителни пациенти/. Докато стабилните серумни нива на HBsAg по време на първите 24 седмици от терапията са ранна индикация за малък шанс за терапевтично индуцирана HBsAg редукция (177).

Според Marcellin и съавт. спад на HBsAg $\geq 1 \log \text{ IU/mL}$ на 24-та седмица от лечение с Тенофовир при HBe позитивни пациенти и генотип A/D или B/C са най-силните независими предиктори на HBsAg загуба (116). Според Su Th и сътрудници, промяната с времето на серумните нива на HBsAg при наивни HBeAg – негативни пациенти не зависи от генотипа – B или C, а от нивата на HBsAg и HBV DNA в началото на проследяването им (168).

Moucarí и съавтори установяват, че генотипа на HBV има силно влияние върху кинетиката на серумните нива на HBsAg по време на PEG-IFN – алфа-2а терапия при HBeAg негативни пациенти. Като средните изходни нива на HBsAg се различавали статистически при различните генотипове – високи нива при генотип A и C, умерени нива при D и E и ниски нива при генотип B. Като в края на 48 седмично PEG -IFN - алфа2а – лечение средното понижаване на количествения HBsAg е най-значимо при генотип A, умерено понижаване при B и D, и по-слабо при генотип C и E. При проследяване след лечението HBsAg продължава да спада при генотипове A и D, докато при B, C и E се наблюдава повишаване (129).

Намаляването на HBsAg с $1 \log_{10} \text{ IU/ml}$ или повече отразява по-добър имуноен контрол на HBV инфекция от старна на гостоприемника.

Комбинацията HBsAg <1000 IU/ml и HBV DNA <2000 IU/ml се свързва с неактивна инфекция при генотип D HBeAg-негативни пациенти. Пациенти с ниска вирусемия и с HBsAg > 1000 IU/ml са показали по-висок риск от HBeAg-отрицателен хепатит, за развитие на цироза и хепатоцелуларен карцином, отколкото тези с HBsAg <1000 IU/ml (56,57,113,170).

В обобщение, интерферон-алфа базираната терапия дава възможност за постигане на продължителен отговор след спирането ѝ при HBe-негативни пациенти, докато NUC много рядко, дори никога, не могат да постигнат такъв при определена във времето терапия. Дългосрочната (неопределена във времето) терапия с NUC може да постигне мощна супресия на HBV репликацията, с биохимична и хистологична ремисия на хепатита. При HBeAg - негативни пациенти, лечение с NUC води до ограничен спад на HBsAg и не могат да бъдат идентифицирани изходни предиктори за понижаването на серумните нива на HBsAg. Изчисленията показват, че за да се постигне загуба на HBsAg са необходими 3 до 4 десетилетия продължителна терапия (68,113,187).

8. Други терапевтични стратегии (извън утвърдените терапевтични алгоритми) при ХХВ

Резултатите от комбинирано приложение на Peg-IFN и NUC са противоречиви и неутвърдени като стандарт на лечение на този етап (84,88,97,118,137,160).

От друга страна удължаването на терапията повече от 48 седмици, дори и с ниски дози интерферон, води до увеличаване процента на траен отговор и съответно на процента на изчистване на HBsAg (90,98,99,105).

Напоследък се обсъждат и други стратегии и медикаменти, които например ограничават навлизането на вируса в незаразена клетка, ваксина-терапия, въвеждане на Th1-цитокени (свързани с клетъчния имунитет) (33,63,64,145,183,184). Терапевтична ваксинация с HBsAg в

комбинация с инхибитори на обратната транскриптаза или имуностимулиращи вещества, не са дали успешен резултат в клинични проучвания. Имуноterapia с различни, произлизащи от HBV антигени или HBV антиген-експресиращи ДНК-и в комбинация с антивирусно лечение са проучвани в различни експериментални системи (59,64,85).

9. Ролята на имуномодулацията при ХХС

Проучване на Antonov K. и съавтори показва промяна в цитокиновата мрежа още в първия ден от началото на противовирусното лечение при болни с хепатит С и значението на генетични фактори за изхода на инфекцията (18).

Имуномодулиращата терапия представлява важна област в лечението на инфекциозните заболявания и е все по-актуална. Според Fauci, имуномодулятор е биологично или небιологично вещество, което влияе пряко върху специфична имунна функция или променя един или повече компоненти на имунорегулаторната мрежа, за да се постигне косвено въздействие върху специфична имунна функция. Различни животински модели са показали, че имуномодулаторна роля има вещества от различен произход: цитокини, фармацевтични продукти, микробни продукти, лечебни растения и др (52).

Inosine pranobex (isoprinosine) е пуринов аналог с имуномодулираща и антивирусни способности, включващи IFN-gamma продукция и засилване на Т-клетъчния имунен отговор (123,144).

Различни проучвания дискутират неговата възможна роля в лечението на хроничната HBV (80,88).

Скорошно наше съобщение показва, че добавянето на Изопринозин към стандартна терапия с нуклеозидни аналози при HBe- позитивни HBV пациенти, би могло да спомогне за HBe – сероконверсия (131, 92).

Isoprinosine стимулира пролиферацията на Т-лимфоцитите, активността на макрофагите, синтеза и освобождаването на лимфокини и лимфотоксини, узряването на Т- и В- лимфоцитите и действието на ендогенните интерферони и лимфокини. Isoprinosine се използва при протрахиранни форми на остър А и В хепатити, както и при CMV предизвикан хепатит (131).

Млако са данните за ролята на имуномодулиращи агенти при хроничната С вирусна инфекция. Единични наблюдения от 90-те години има за приложението на Inosine pranobex при хроничен хепатит С (139,140).

Последните години се натрупаха данни за имуномодулиращия ефект на Рибавирин върху различни компоненти на имунната система. Ribavirin индуцира превключване на Th фенотипа от тип 2 (хуморален) в тип 1 (клетъчен) (75,135,136). Рибавирин засилва експресията на специфичните интерферон чувствителни гени (ISG) чрез подобряване на IFN- α -JAK / STAT сигнализирането, което повишава IFN- α антивирусна активност срещу HCV (166).

Според Rotman и сътрудници монотерапията с Ribavirin понижава серумните IP-10 нива, но няма ефект върху ISG експресията в PBMC (периферни мононуклеарни клетки) (158). И Според Nouredin монотерапията с рибавирин води до понижаване нивата на IP-10 (135).

Самостоятелната терапия с Рибавирин при пациенти с хронична С вирусна инфекция е основно прилагана като предхождаща стандартната двойна терапия с Пег-интерферон. Продължителността на монотерапията с Рибавирин в различните проучвания е обикновено около 4-6 седмици, като е провеждана при нелекувани пациенти, при такива без отговор на предишна терапия и такива с релапс. Според някои от данните Ribavirin монотерапията предизвиква лек, но стабилен спад в хепатит С вирусемията (55,124,135).

Смисълът на предварителното лечение с Рибавирин се базира на имуномодулиращия му ефект. Рибавирин подобрява pSTAT4 и IFN- γ отговор на НК клетки към IFN- α -лечението, което може да допринесе за подобряване на вирусологичен отговор (144). Има проучвания, които показват, че предшестваща монотерапия с Рибавирин, преди стандартна двойна терапия, води до повишаване процента на ТВО при пациенти с рецидив на предходна терапия (175,180). Според други данни монотерапията с Рибавирин няма значителен благоприятен ефект върху вирусологичен отговор или върху степента на чернодробно увреждане, но може преходно да се подобри биохимичния отговор. Ribavirin увеличава риска от анемия (29).

Продължаване на рибавирин като монотерапия /до 6 месеца/ след постигане на вирусологичен отговор в края на стандартна двойна терапия, не подобрява трайния вирусологичен отговор (163).

Zoullim и съавтори показват възможност за прилагане на монотерапия с Рибавирин при пациенти, които имат противопоказания за интерферонова терапия или като палиативна при пациенти, неотговорили на интерферонова терапия. Те наблюдават значителен брой пациенти с хронична С вирусна инфекция приемащи само Рибавирин в продължение до 11 месеца. Отчитат биохимичен отговор, а при 10% (8% от пациентите хроничен хепатит и 2% от пациентите с ЧЦ) от пациентите и изчистване на HCV RNA (185).

Единични съобщения има за комбинираното приложение на Изопринозин и Рибавирин. Такова е съобщението преди повече от 20г. на Schulof и съавтори на комбинирано приложение на двата медикамента при пациенти с HIV. Комбинацията била добре понесена, но без ефект върху супресия HIV (161).

Данните за монотерапия с Рибавирин при пациенти с хронична С вирусна инфекция са малко и са противоречиви. Единични изследвания има за динамиката на IP-10 нивата при самостоятелно приложение на Рибавирин при такива пациенти. Липсват данни за ролята на комбинирано приложение на Изопринозин и Рибавирин при пациенти хронична С инфекция, както и при такива с оформена чернодробна цироза.

10. Обобщение

Хепатологията и в частност лечението на хроничната HCV инфекция се развиват с бърза скорост през последните години. Появиха се т. нар. безинтерфероновите режими за лечение на хроничната HCV инфекция, които показват повече от 90% успеваемост, дори при напреднало чернодробно заболяване. Въпреки обещаващите резултати, ограничение е високата цена и все още неповсеместното разпространение.

Поради това, в настоящи момент, стандартната двойна терапия за лечение на хроничната HCV инфекция все още е първи избор за лечение, при пациенти нелекувани до сега и с ненапреднала чернодробна болест, свързана с HCV инфекция. Затова открояването на фактори, които биха били предиктори за отговора на двойна терапия, ще подпомогне селектирането на пациенти, които са неподходящи за нея, с оглед насочване към новите терапевтични стратегии. Такива показатели като IP-10, витамин Д, витамин В12, фолати, липиден профил, IL28В генотипа, които са слабо проучени при българската популация. Малко данни има за ролята и динамиката, по време лечение, на IP-10 при пациенти с ХХВ. Важно е значението на предиктивни фактори в хода на самото лечение – като бързия вирусологичен отговор, спада на хемоглобина и др.

Относно хроничната HBV инфекция, в настоящия момент, няма нови регистрирани лекарства. Оптимизирането на наличните терапевтични режими остава настоящо решение на проблема. Количественото измерване

на HBsAg не е широко застъпено в ежедневната клинична практика при българските пациенти. Малко данни има за ролята му и проследяване на динамиката му по време на лечение със NUC или интерферон.

Алтернативен подход при пациентите с ХХВ на интерферонова терапия е удължаването на терапията повече от 48 седмици, проследявайки нивата на количествения HBsAg. Липсват данни за българския опит.

Малко са данните за ролята на имуномодулацията при хроничните вирусни хепатити, особено при HCV. Проблем представляват пациентите с напреднала чернодробна болест, които имат няколко неуспешни лечения със стандартна двойна и тройна терапии. Ние проследихме една такава група на фона на лечение с Рибавирин и Изопринозин. Проследихме динамиката на IP-10 по време на тази терапевтична схема. Липсват данни в световната литература.

IV. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ:

Изследване на различни биомаркери в хода на противовирусното лечение на хроничните вирусни хепатити

ЗАДАЧИ:

1. Да анализираме IL28B генотипния статус като предиктивен фактор при стандартната двойна терапия на хронична HCV инфекция
2. Да анализираме серумните нива на IP- 10 като предиктивен фактор и промяната им при стандартната двойна терапия на хронична HCV инфекция, както и при експериментална терапия на рефрактерни на интерферон пациенти
3. Да изследваме метаболитни показатели (витамин Д, фолати, витамин В 12, липиди) и значението им за терапевтичния отговор при пациенти с хронична HCV с ненапреднало чернодробно увреждане
4. Да анализираме серумните нива на IP- 10 и промяната им при стандартната терапия на хронична HBV инфекция с нуклеозидни аналози или Peg-interferon-alfa-2a.
5. Да проследим количествения HBsAg при HBeAg-позитивни и HBeAg негативни пациенти, провеждащи терапия с нуклеозидни аналози или Peg-interferon-alfa-2a.
6. Да анализираме възможността за удължаване на терапията с Peg-interferon-alfa-2a, за да се ускори HBsAg сероконверсията.

V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица

Анализираха се данните на общо 159 лица, изследвани и лекувани в клиниката по гастроентерология към УМБАЛ "Свети Иван Рилски" МУ-София за периода 2011-2014г, разделени в следните основни групи:

I група – 97 пациенти с хронична вирусна инфекция С, нелекувани до сега – (56 мъже и 41 жени от 19 до 62; средна възраст $39 \pm 11,57$), с хистологично верифицирано чернодробно заболяване при 76 пациенти. При 7 от пациентите без чернодробна биопсия има доказана компенсирана чернодробна цироза. При останалите 14 пациенти без ЧБ има коагулационни нарушения или други причини, за да не се проведе. Тези 14 пациенти са с хроничен хепатит, без данни за портална хипертония. Генотип 1 – са 79 пациенти, генотип 3 – 17, генотип 4 – 1 пациент. Хистологично доказана стеатоза има при 35 пациенти (Таблицы 1, 4 и 5).

В настоящото проследяване, всички 97 пациенти с хронична HCV инфекция провеждаха стандартна двойна терапия с Peg-interferon- alfa 2a и Рибавирин.

При 20 от пациентите изследвахме серумни нива на IP-10 – изходно, 4 седмица, 12 седмица от лечението. При същите пациенти изследвахме изходно преди лечението серумни нива на витамин Д, витамин В12, фолати, липиден профил, серумна глюкоза. При всички 97 пациенти – изследвахме пълна кръвна картина, аминотрасферази, ГГТ, АФ,

билирубин, албумин и други рутинни показатели преди началото на лечението, по време и след лечението.

Таблица 1. Изходни характеристики на пациентите от Група I пациенти с хронична HCV инфекция, нелекувани преди проследяването.

Характеристики	Стойност или брой пациенти
Брой пациенти	97 пациенти
Възраст – средна, граници	39, 19-62; SD 11.57
Мъже (брой пациенти)	56 пациенти
Жени	41
Генотип 1	79
Генотип 3	17
Генотип 4	1
Чернодробна хистология /META VIR/:	
Хроничен хепатит /F 0-3/	73 пациенти
F0	3
F1	43
F2	23
F3	4
ЧЦ /F4/ или без биопсия	10 /ЗЧБ/
Без чернодробна биопсия, но без данни за ЧЦ	14
HCV RNA IU/ml изх., средна	1 157 008; 3120-8 870 000
Log 10 Изх.	5,51, 3,4-9,90
<200 000	35 пациенти
200 001-400 000	11
>400 000	46
Стеатоза /хистологично/ - 64 пац. Изследвана	
Липсва	29 пациенти
Лека 10-29 %	15
Умерена 30-49%	11
Тежка >50%	9
HAV IgG изсл. При 71 пациенти	
/+/	24
/-/	47

Характеристики	Стойност или брой пациенти
antiHBcorTotal при 89 пациенти	
/+/	23
/-/	66
IL28В при 82 пациенти	
СС	17 пациенти
СТ	49
ТТ	16
ИТМ (kg)/m²	
Поднормена ТМ (поднормено тегло) <18,5	6
Нормална ТМ (нормално тегло) 18,5-24,9	56
Наднормена ТМ (наднормено тегло) 25,0-29,9	27
Затлъстяване ≥ 30	8

II група – 57 пациенти с хронична вирусна инфекция В - наличие на HBsAg в серума повече от 6 месеца и повишени стойности на АЛАТ 6 месеца преди започване на лечението. Изключени бяха HDV, HCV и HIV ко-инфекции при всички пациенти.

1) 20 пациенти на лечение с нуклеоз(т)идни аналози -16 мъже и 4 жени, възраст 42,5 (29-63г.) (медиана, граници). Първоначално 9 от 20-те пациенти бяха HBeAg-позитивни и 11-HBeAg-негативни (Табл. 13). Проследихме количествен HBsAg – изходно, 3-ти и 12-ти месец; серумни

нива на IP-10 изходно и 3-ти месец; пълна кръвна картина и рутинни биохимични показатели

2) 31 пациенти, провеждащи стандартна терапия с Peg-interferon- alfa 2a – 26 мъже и 5 жени, възраст 35 (21-55) (медиана, граници). Първоначално 5 от 31-мата пациенти бяха HBeAg-позитивни и 26-HBeAg-негативни. Всички пациенти се лекуваха с Пегилиран интерферон alfa-2a (Табл.17). Проследихме количествен HBsAg – изходно, 3-ти, 6-ти, 9-ти, 12-ти месец; 6 месеца след лечение; IP-10 изходно и 12 седмица (при 10 пациенти); пълна кръвна картина и рутинни биохимични показатели

3) 6 пациенти - 3 мъже и 3 жени, 38 години (медиана), граници 20 - 51. Всички с хронична HBV инфекция, продължително време лекувани с NUC и с постигнат стабилен вирусологичен отговор (неоткриваема HBV DNA при проследяване в хода на лечение). Четирима от тях бяха на лечение с Тенофовир и двама с Телбивудин (табл. 25). Лечението с посочените NUC беше спряно и беше започнато лечение с Peg-IFN alfa-2a и Lamivudine. В този момент всички пациенти бяха HBeAg-негативни. При двама пациенти имаше ниско ниво на вiremия при нормални стойности на АЛАТ, поради кратка пауза между двете терапии. От 6-тия месец на комбинирано приложение, пациентите останаха на терапия само с Peg-IFN alfa-2a за различен период, съобразно нивата на количествения HBsAg.

III група - 5 пациенти с напреднала чернодробна болест (HCV), неколккратно неуспешно лекувани, относно хроничната С инфекция. Двама от тях - мъже и три жени, на възраст - медиана 63, граници 60-71 години. Групата включва пациенти с напреднала хронична инфекция HCV генотип 1, (дългогодишна история на инфекцията с предходни неуспешни курсове на лечение със стандартна двойна интерферон-базирана терапия. Бяха изключени HDV, HBV и HIV ко-инфекции

(табл.9). При всички пациенти се започна прием на Ribavirin в доза съобразена с тяхното тегло и Изопринозин в алтернативна схема. Проследиха се HCV RNA, аминотрансферази, ГГТ и рутинни кръвни параметри, преди начало на посочения терапевтичен режим, на 40-ти ден, 3-ти месец, 6-ти месец и 12 месец. Серумни нива на IP-10 бяха изследвани – изходно, на ден 10, 20, 40, 60, месец 3, 6 и 12.

Обобщено IP-10 – се изследва при 54 пациенти.

1. 20 пациенти с хронична С вирусна инфекция, нелекувани до сега – изходно, на 4-та и 12-та седмица от лечението.
2. 5 пациенти с хронична С вирусна инфекция с предишни неуспешни лечения със стандартна противовирусна терапия - IP-10 се изследва изходно, 20-ден, 40- ден, 3 месец, 6 месец и 12 месец.
3. 29 пациенти с хронична В вирусна инфекция – 10 от тях, провеждащи лечение с Пег-интерферон и 19 с NUC - изходно и на 12-та седмица от лечението.

Количествено измерване на HBsAg при:

20 пациенти с хронична HBV инфекция – на терапия с NUC – изходно 3, 12-ти месец

31 пациенти на лечение с Интерферон и 6 пациенти на терапия с IFN и NUC – на всеки 3 месеца

Витамин Д , витамин В12 и фолати – серумни нива – изходно преди започване на първа стандартна двойна терапия при 20 пациенти с хроничен хепатит С.

липиден профил - изходно преди започване на първа стандартна двойна терапия при 20 пациенти с хроничен хепатит С

Стандарти лабораторни изследвания – ПКК и биохимични показатели – при всички пациенти при проследяване.

2. Използвани методи

- анамнеза
- физикален статус, демографски данни, вкл. ИТМ, коремна обиколка, измерена през пъпа;
- 12-канален ЕКГ запис;
- абдоминална ехография - конвенционално изследване и Доплерова ехография;
- лабораторни изследвания - пълна кръвна картина, чернодробни ензими- АСТ, АЛТ, ГГТ, АФ; общ и директен билирубин, общ белтък, албумин, протромбиново време/INR, аРТТ, фибриноген, CRP, общо изследване на урина;
- триглицериди, общ холестерол, заедно с HDL, LDL, VLDL;
- креатинин, урея, електролити;
- специализирани изследвания:

1) **Молекулярно-биологични техники - Real-time PCR** (полимеразна верижна реакция в реално време) за количествено определяне на HCV RNA и HBV DNA (LCycler Real time PCR) – метод на избор в диагностиката и определяне на терапевтичния отговор при хроничен хепатит С и В, съответно. Процедурата следва общия принцип на полимеразна верижна реакция, основната му черта е, че мултиплицираната новосинтезирана ДНК се регистрира като прогресия на реакцията в реално време.

2) **INNO-LiPA HCV II** (Innogenetics NV, Ghent, Belgium) – за определяне на генотип на HCV

3) **ELISA** – техника на принципа на количествено измерване на антиген/антитяло комплекса по стандартна крива - за изследване на IP-10

Ray Bio ® Human IP-10 ELISA kit (при 20 пациенти с хроничен хепатит С и 29 с хроничен хепатит В).

BioLegend ®, LEGEND MAX™ Human CXCL10/IP-10 ELISA kit (при 5-ма пациенти с напреднала хронична чернодробна болест HCV (група V).

4) **Електрохимулюминисцентен имунологичен тест** - за количествено определяне нивото на повърхностния антиген на хепатит В (HBsAg), Roche®. Биохимичен тест, който измерва концентрацията на макромолекули в разтвор чрез използване на антитела.

5) **Ензимен имуен метод** – за определяне на **HBeAg/anti-HBe** статуса (антиген, антитела).

6) **Течна хроматография-мас спектрометрия** за определяне на серумни нива на витамин Д. Хроматографията е метод за разделяне на една смес на съставните и компоненти, при които същите се разпределят между две несмесващи се фази. Според физичното състояние на неподвижната фаза един от видовете хроматография е течна. Течна хроматография-мас спектрометрия е аналитична техника, която обединява възможностите за разделение на течна хроматография с възможностите за анализ на мас-спектрометрия. Това е мощна техника с висока чувствителност и селективност.

7) **IL28 В генотипизиране:** Геномния регион, свързан с отговор на интерферон-базирана терапия при HCV инфекция, се намира върху хромозома 19 и съдържа множество единични нуклеотидни последователности. Най-силно свързаните единични нуклеотидни последователности са rs12979860. За генотипизирането на IL28В използвахме кит за специфично алелно дискриминиране и последваща система за откриване на последователности.

- Стандартни лабораторни методи - за определяне на серумни нива на фолати, витамин В 12, липиден профил.
- Статистическа обработка на данните

Получените резултати за серумните нива на витамин Д бяха класифицирани в следните групи:

- дефицит – 0-24,9 nmol/l
- изразена недостатъчност – 25-49,9 nmol/l
- лека недостатъчност – 50-79,9 nmol/l
- достатъчност – 80-200 nmol/l
- токсичност – над 200 nmol/l

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

При болните с хроничен хепатит В и С използвахме оценката за степен на активност и стадий на фиброза по Metavir.

Тежестта на чернодробната цироза оценихме по Child-Pugh класификацията (табл. 2).

Таблица 2. Класификация на чернодробната цироза по по Child-Pugh.

Child-Pugh клас	А	В	С
Билирубин $\mu\text{mol/l}$	Под 34	35-51	Над 51
Албумин g/l	Над 35	35-28	Под
Протромбинов индекс или Протромбиново време или INR	Над 70% от 1 –4 sec под 1.6	70-40% 4-6 sec 1.6 – 2.0	Под 40 % над 6 sec над 2.0

Child-Pugh клас	А	В	С
Асцит	Липсва	Лесно се контролира	Трудно се поддава на контрол
Енцефалопатия	Липсва	Дискретна	Изразена
Брой точки	1	2	3

Промените в телесната маса изчислихме на базата на ИТМ според отклоненията в ИТМ по Класификацията на СЗО за телесното тегло (WHO, 1999) (табл.3).

Таблица 3. Промени в телесната маса според ИТМ.

Група	ИТМ (kg)/m ²
Поднормена ТМ (поднормено тегло)	< 18,5
Нормална ТМ (нормално тегло)	18,5 – 24,9
Наднормена ТМ (наднормено тегло)	25,0 – 29,9
Затлъстяване	≥ 30,0

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

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

VI. РЕЗУЛТАТИ

1. IL28B генотипен статус и ролята му като предиктивен фактор на отговора при стандартната двойна терапия на хронична HCV инфекция

Пациенти с хронична HCV инфекция, генотип 3

17 от проследените пациенти бяха с 3 генотип HCV. От тях 6 са жени и 11 – мъже, на възраст $31 \pm 4,01$ (медиана), от 22 до 39. При 15 пациенти болестта е доказана хистологично, като 2-ма са със степен на фиброза -0, 9 са със степен на фиброза 1, 4-ма са със степен на фиброза 2. Двама пациенти са без чернодробна биопсия, един от тях (жена) е с чернодробна цироза (Табл. 4).

Таблица 4. Изходни характеристики на пациентите с хронична HCV инфекция, генотип 3.

Характеристики	Стойност или брой пациенти
Брой пациенти	17
Възраст – медиана, граници	31, 22-39; SD 4,01
Мъже (брой пациенти)	11
Жени	6
Чернодробна хистология /META VIR/:	
Хроничен хепатит /F 0-3/	15 пациенти
F0	2
F1	9
F2	4
F3	0
ЧЦ /F4/ или без биопсия	1
Без чернодробна биопсия, но хр. Хепатит	1
HCV RNA IU/ml изх., медиана, граници, стандартно отклонение	453500, 27 500-3 760 000; SD 1100 942
$\leq 400\ 000$ IU/ml	6 пациенти
$> 400\ 000$ IU/ml	10

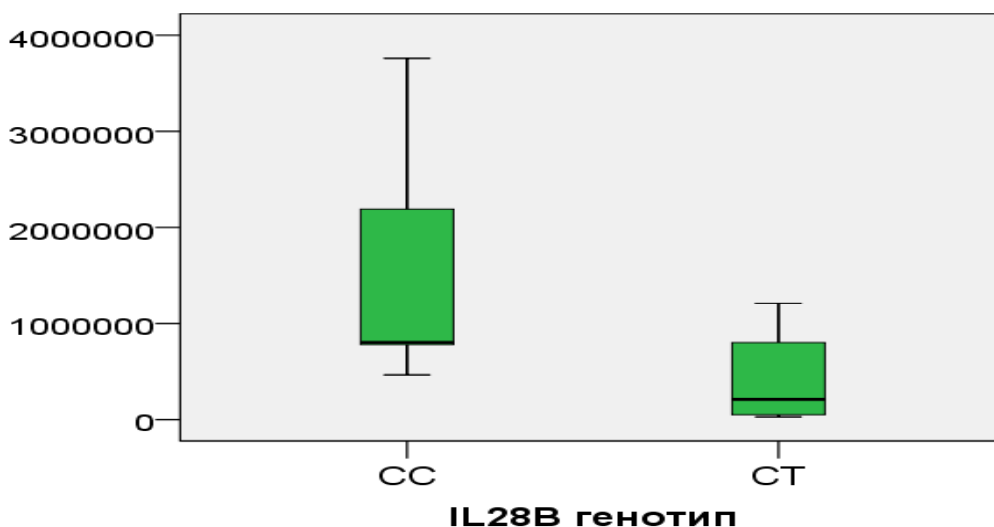
Характеристики	Стойност или брой пациенти
АСАТ U/L, изх., медиана, граници, стандартно отклонение	53, 21-241; 60,2
АЛАТ U/L, изх., медиана, граници, стандартно отклонение	104, 26-235; 64,7
ГГТ U/L, изх., медиана, граници, стандартно отклонение	24, 10-169; 44,06
Стеатоза /хистологично/ - 13 пац. Изследвана	
Липсва	5 пациенти
Лека 10-29 %	2
Умерена 30-49%	2
Тежка >50%	4
antiHBcorTotal при 14 пациенти	
/+/	3
/-/	11
IL28В при 14 пациенти	
С/С	5
С/Г	9
Т/Г	0
ИТМ (kg)/m²	
Поднормена ТМ (поднормено тегло) <18,5	1
Нормална ТМ (нормално тегло) 18,5-24,9	11
Наднормена ТМ (наднормено тегло) 25,0-29,9	4
Затлъстяване ≥ 30	1

Петнадесет от 17-те пациенти постигнаха ТВО след стандартна двойна терапия с Рибавирин и Пегинтерферон. Само двама пациенти (един мъж и една жена) не постигат ТВО. При тях е налице рецидив. Всички 17 пациенти

постигат бърз вирусологичен отговор. При 14 пациенти имахме изследван генотип на IL28B. Петима са C/C и 9 C/T. Като при пациентите с рецидив единият е C/C, а другият C/T. При 8/17 се отчита анемия на 4 седмица от лечение. Няма връзка между постигането на ТВО при пациентите с генотип 3 и пола, IL28B генотипа, изходната вирусемия, изходните нива на АСАТ и АЛАТ, степента на стеатоза, появата на анемия в хода на лечение (4 седмица) ($p > 0.05$). Силна негативна корелация има между наличието на чернодробна цироза и постигането на ТВО ($r = -0.685$; $p = 0.002$).

Установихме значима негативна корелация между наличие на antiHbcor-total антитела и степента на фиброза ($r = -0.822$, $p = 0.001$). Като при пациентите с позитивни antiHbcor-total антитела степента на фиброза е по-висока. Установява се корелация между IL28B генотипа и вирусемията ($r = -0.625$, $p = 0.022$) – пациентите с генотип C/C (всички 5 пациенти) са с по-висока вирусемия ($> 400\,000$ IU/ml). Има статистически значима разлика между нивата на изходната вирусемия при пациентите с генотипове C/C и C/T ($p = 0.045$, Mann-Whitney – непараметричен анализ) (фиг. 1).

Фигура 1. Статистическа разлика между изходната вирусемия при пациенти с генотип 3 и C/C и C/T IL28 B генотипове



Установява се корелация между изходните нива на АСАТ и АЛАТ с IL28В генотипа ($r=-0.740$, $p=0.002$ и $r=-0.610$, $p=0.020$ съответно). Като при пациентите с генотип С/С изходните нива на АСАТ и АЛАТ са по-високи в сравнение с тези при С/Т. Статистически значима разлика има между изходните нива на АСАТ и АЛАТ при пациентите с генотип С/С и С/Т ($p=0.004$ и $p=0.029$ съответно).

Пациенти с хронична HCV инфекция, генотип 1

Седемдесет и девет от проследените пациенти бяха с хронична HCV инфекция, 1 генотип. От тях 34 са жени и 45 – мъже, на възраст 40,9 (средна), 40 (медиана) $\pm 11,97$, от 19 до 62. При 60 пациенти болестта е доказана хистологично, като 1 е със степен на фиброза -0, 34 са със степен на фиброза 1, 18-ма са със степен на фиброза 2; 4-ма с F3 и 3-ма с F4. От пациентите, при които не е проведена чернодробна биопсия (19 пациенти), 6-има са с чернодробна цироза, а останалите с хроничен хепатит (табл. 5).

Таблица 5. Изходни характеристики на пациентите с хронична HCV инфекция, генотип 1.

Характеристики	Стойност или брой пациенти
Брой пациенти	79
Възраст – средна, граници	40,9, 19-62; SD 11,97
Мъже (брой пациенти)	45
Жени	34
Чернодробна хистология /METAVIR/:	
Хроничен хепатит /F 0-3/	57
F0	1
F1	34
F2	18
F3	4

Характеристики	Стойност или брой пациенти
ЧЦ	9
- Хистологично доказана (F4)	3
- Без ЧБ	6
Без чернодробна биопсия, но хр. Хепатит	13
HCV RNA IU/ml изх., средна, медиана, граници, стандартно отклонение	1 221 443, 07; 312 000; 3120-8870000; SD 1 930 087,70
≤400 000	39
>400 000	36
АСАТ U/L, изх. средна, медиана, граници, стандартно отклонение	51,67; 39; 20-214; SD38,37
АЛАТ U/L изх., средна, медиана, граници, стандартно отклонение	75,45; 60; 17-377; SD 60,9
ГГТ U/L, изх., средна; медиана, граници, стандартно отклонение	72; 50; 12-315; SD 61,9
Стеатоза /хистологично оценена/ - 50 пациенти	
Липсва	23 пациенти
Лека 10-29 %	13
Умерена 30-49%	9
Тежка >50%	5
antiHBcorTotal при 74 пациенти	
/+/ /-/	20 54
Характеристики	Стойност или брой пациенти
anti HAV-IgG при 59 пациенти	
/+/ /-/	21 38
IL28В при 67 пациенти	
СС	12
СТ	39
ТТ	16
ИТМ (kg)/m2	
Поднормена ТМ (поднормено тегло) <18.5	5
Нормална ТМ (нормално тегло) 18.5-24.9	44

Характеристики	Стойност или брой пациенти
Наднормена ТМ (наднормено тегло) 25.0-29.9	23
Затлъстяване ≥ 30	7

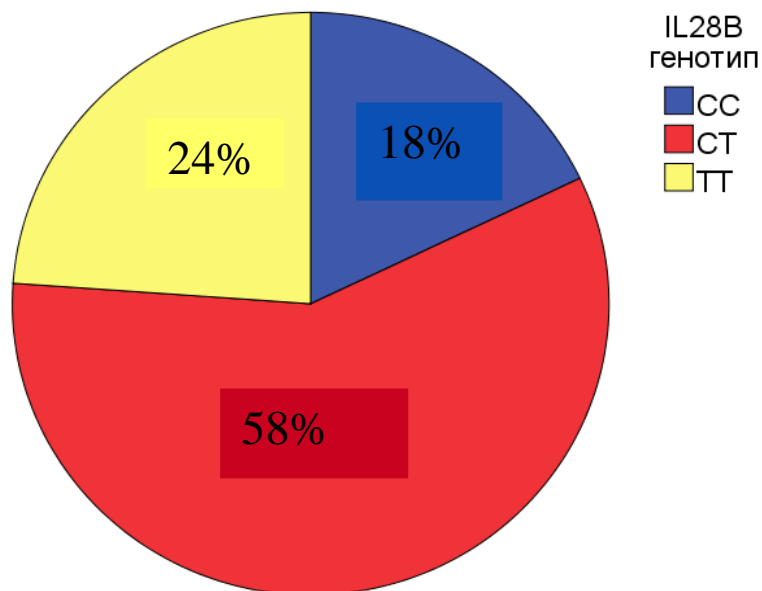
Установи се статистически значима разлика между възрастта при пациентите с генотип 1 и 3 ($p=0.002$), като при генотип 1 възрастта е по-голяма.

41 (52%) от 79-те пациенти постигнаха ТВО след стандартна двойна терапия с Рибавири и Пегинерферон. При 32 пациенти не се постигна ТВО. При 20 от тях е налице рецидив. При 12 пациенти – липсва отвор (липсва спад с повече от 2 log, спрямо изходната виремия или е налице спад, но в последствие няма отговор на 6-ти месец от лечението (частично отговорили). При 6 пациенти – отговора (6 месеца след лечение) е неизвестен (на този етап).

При 33 пациенти е постигнат бърз вирусологичен отговор, а при 46 - не. При 71 пациенти се отчете ранен вирусологичен отговор, като при 60 от тях той е пълен (негативна HCV RNA), а при 11 – има спад с повече от 2 log, но HCV RNA – не е негативна. При 7 пациенти – няма спад на виремията с 2 log или повече.

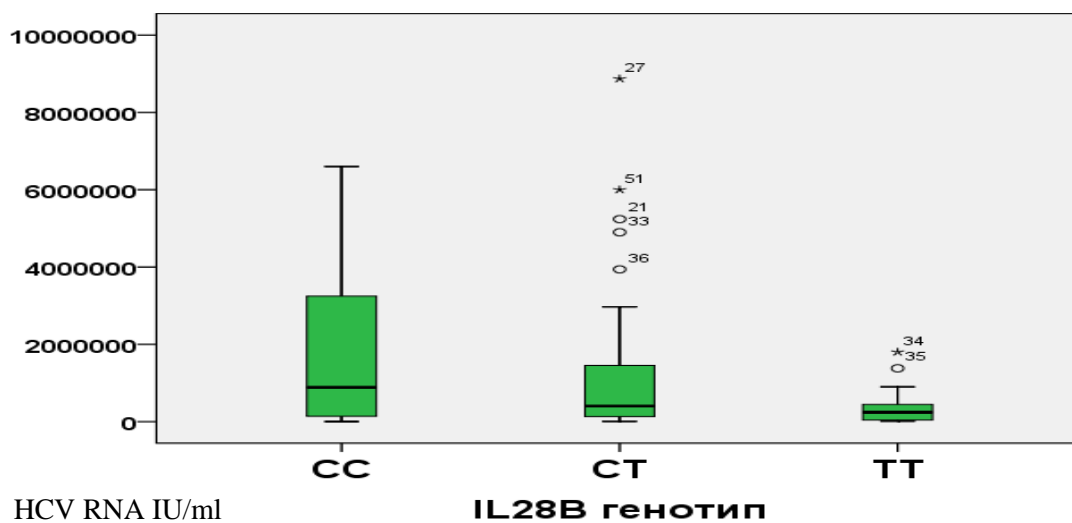
При 67 пациенти имаме изследван генотип на IL28. При 12 пациенти се установи генотип С/С при 39- С/Т и при 16 – Т/Т (Фиг. 2);

Фигура 2. Разпределение на пациентите с хронична HCV генотип 1, според IL28 В - генотипа



Установява се корелация между IL28B генотипа и изходните нива на вирусния товар в времето ($p=0.032$, $r=0.268$), като при C/C генотипа вирусния товар е по-висок. Не се установява, обаче статистически значима разлика между отделните групи (фиг. 3).

Фигура 3. Изходна вирусна натовареност при пациентите с хронична HCV инфекция генотип 1, според IL28 B генотипа



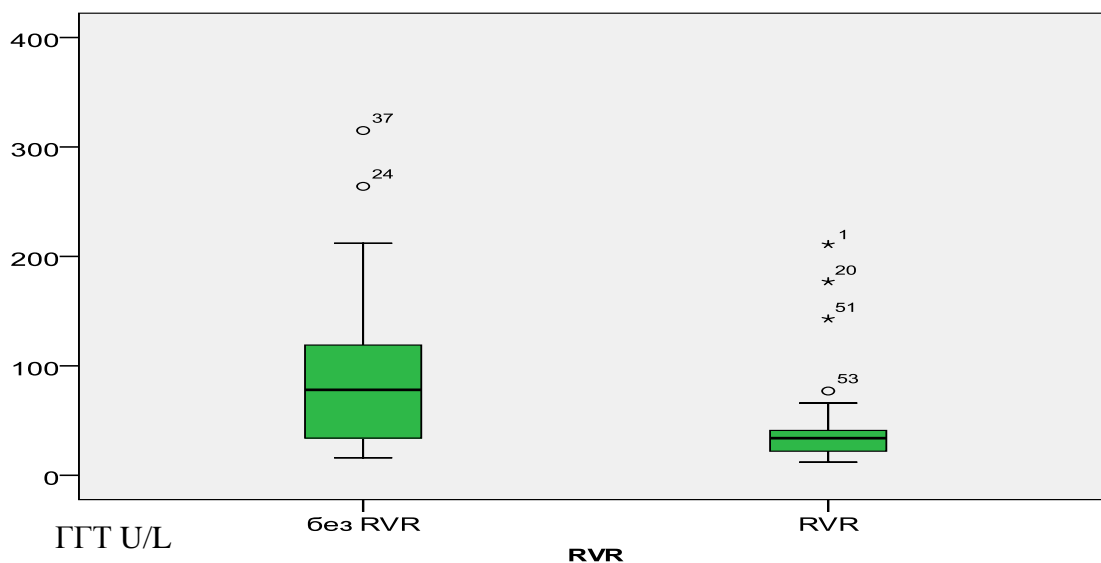
Установява се статистически значима разлика между изходните нива на АЛАТ и TG при пациентите със СС и ТТ генотип (съответно $p=0.023$, $p=0.025$). Като при пациентите с генотип СС изходните нива на АЛАТ са по-високи от тези с ТТ генотип (89 U/L срещу 47 U/L, медиана), докато нивата на TG са по-ниски при наличие на С-алела (СТ и СС) (0,70 mmol/L медиана), в сравнение при пациенти с ТТ генотип (1,15 mmol/L, медиана).

Пациенти с RVR:

Няма връзка между изходните нива на АСАТ, АЛАТ и HCVRNA, степента на фиброза, наличието на стеатоза, телесното тегло, пола, редуцирането на дозата на медикаментите и постигането на RVR ($p>0.05$).

Установихме негативна корелация между изходните нива на ГГТ и постигането на RVR ($p=0.001$, $r=-0.354$). Като при пациентите, при които няма постигнат RVR, нивата на ГГТ са по-високи ($p=0.000$) (фиг. 4).

Фигура 4. Изходни нива на ГГТ при пациенти с хронична HCV инфекция генотип 1, при които има постигнат ранен вирусологичен отговор и при пациенти без постигнат такъв отговор



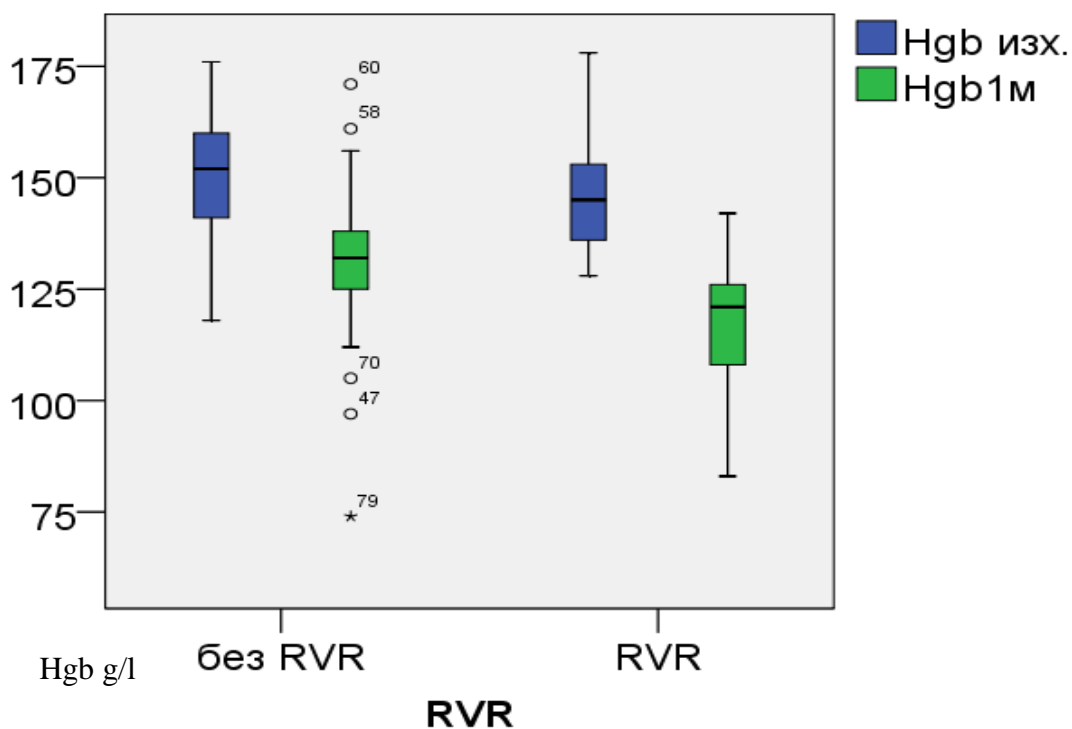
Няма статистически значима разлика между изходните нива на виремия при пациенти с RVR и тези без RVR ($p>0.05$). Няма статистически значима разлика между степента на фиброза при пациенти с RVR и тези без RVR ($p>0.05$).

Установи се корелация има между IL28B генотипа и постигането на RVR ($p=0.010$, $r=0.314$). IL28B генотипизиране е налично при 28 от 33 пациенти с RVR. С генотип C/C са 9 пациенти с RVR, с генотип C/T - 15, а с T/T – 4.

Установява се корелация между наличието на анемия на 4-та седмица от лечението и постигането на RVR ($p=0.000$; $r=0.439$, Spearman). Като при 24 от пациентите с RVR (33) има анемия на 4 седмица от лечението.

Има статистически значима разлика между хемоглобна на 4-та седмица при пациентите с RVR и без RVR ($p=0.000$) (Mann-Whitney) (фиг. 5).

Фигура 5. Статистически значима разлика между хемоглобна на 4-та седмица при пациентите с RVR и без RVR



Не се установява корелация между постигането на RVR и наличието на левкопения на 4-та седмица от лечението ($p>0.05$).

Налице е силна позитивна корелация между наличието на RVR и постигането на EVR ($p=0.000$, $r=0.398$) и ТВО ($p=0.000$, $r=0.523$), както и между EVR и ТВО ($p=0.000$, $r=0.742$).

Нама статистически значима разлика между изходните нива на виремията, АСАТ и АЛАТ, както и в степента на фиброза при пациентите с или без RVR, но с пълен EVR.

Пациенти с ТВО:

- 25 от тях са мъже и 16 жени

- С/С – 10 пациенти; С/Т - 22; Т/Т- 5. Установява се корелация между IL28B генотипа на пациентите с HCV генотип 1 и постигането на ТВО ($p=0.024$, $r=0.282$).

- Анемия на 4 седмица от лечението – при 24 пациенти (58,5%)

- Налице е корелация между наличието на анемия на 4 седмица от лечението и между постигането на ТВО ($p=0.016$, $r=0.280$). Липсва корелация между наличието на левкопения на 4-та седмица от лечението и постигането на ТВО.

- 39 от пациентите (95%) са с хроничен хепатит и само 2-ма са с чернодробна цироза Child A

- При 2 от 5-мата пациентите с Т/Т генотип има постигнат RVR.

- При всички пациенти с ТВО има пълен ранен вирусологичен отговор.

- RVR има при 28 пациенти (68 % от пациентите с ТВО).

- Установява се значима корелация между постигането на RVR и постигането на ТВО ($p=0.000$, $r=0.558$), както и между постигането на EVR и постигането на ТВО ($p=0.000$, $r=0.595$).

- 17 пациенти са с изходна виремия над 400 000 IU/ml, а 23 – с $\leq 400\ 000$ IU/ml

- При 27 пациенти има оценена хистологично степента на стеатозата, като при 25 пациенти е от липсваща до умерена и само при 2-ма е тежка.

Установява се статистически значима разлика между теглото на пациентите, при които дозата на медикаментите е редуцирана или не – при пациентите с по-ниско тегло – по-често се налага корекция на дозите, поради странични реакции (анемия и/или левкопения) ($p=0.003$).

При пациентите без ТВО – тези с липса на спад на вирусемията на 12 седмици $\geq 2 \log$ или повече или с рецидив на болестта IL28B генотипа е определен при 27/32 пациенти. Само 2-ма са С/С, а останалите от т.нар. неблагоприятни генотипове – С/Т (17), Т/Т (8).

Пациентите с липса на отговор (липса на спад с 2 или повече \log на трети месец от лечението), които са 12, са на възраст 43 години (медиана), 27-61г. Само при 2-ма се появява анемия на 4-та седмица от лечението. При 10 от тях има изследван IL28B, като при 4-ма генотипа е Т/Т, а при 6 – С/Т. Няма пациенти без ранен вирусологичен отговор, които да са с генотип С/С.

При 4-ма има диагностицирана ЧЦ. При половината пациенти HCV RNA е $> 400\ 000$, а при другата половина $\leq 400\ 000$. При половината от пациентите е редуцирана дозата на медикаментите по време на лечение.

Двадесет пациенти с рецидив на инфекцията, възраст -50 години (медиана), 19-60. При половината е налице анемия на 4-седмица от лечението. Двама пациенти с с генотип С/С, 11- с С/Т, и 4 – Т/Т. При 11/20 – вирусемията е над $400\ 000$, а при 6-ма $\leq 400\ 000$. При половината пациенти досите на медикаментите са редуцирани по време на терапията.

Няма статистически значима разлика между Hgb на 4-та и 12-та седмица при пациенти с ТВО и тези без ТВО ($p > 0.05$).

Установява се негативна корелация между възрастта на пациента и постигането на ТВО ($p=0.009$, $r=0.304$). Като при пациентите без ТВО възрастта е по-висока. Но не се установява статистически значима разлика между възрастта на двете групи пациенти ($p>0.05$).

Установява се негативна корелация между постигането на ТВО и наличието на ЧЦ ($p=0.005$, $r=-0.291$).

Установява се корелация при пациентите с генотип 1, между възрастта на пациента и постигането на ТВО ($p=0.010$, $r = 0.301$).

2. Серумните нива на IP- 10 като предиктивен фактор и промяната им при стандартната двойна терапия на хронична HCV инфекция, както и при експериментална терапия на рефрактерни на интерферон пациенти

При 20 от пациентите с хронична HCV инфекция (табл. 6), генотип 1 бяха проследени изходно – 4-та седмица и 12 седмица нивата на IP-10. Спрямо RVR и пола – бяха подбрани 10 мъже и 10 жени, като половината от съответно са с RVR

Таблица 6. Изходни характеристики на 20-те пациенти с хронична HCV инфекция, генотип 1 при които се изследваха IP-10 и други маркери.

Характеристики	Стойност или брой пациенти
Възраст медиана, граници	37,5 20-58
Пол	
Мъже	10
Жени	10

Характеристики	Стойност или брой пациенти
ИТМ <18,5 18,5-24,9 25-29,9 >30	3 пациенти 12 3 2
Фиброза /F/ 1 2 3 4 хроничен хепатит /без проведена ЧБ/	11 пациенти 4 1 1 3
Стеатоза /хистологично доказана/ 16 пациенти липсва лека умерено тежка тежка	12 пациенти 2 2 0
НСV RNA IU/ml медиана, граници	199 000 20 000-6 600 000
Характеристики	Стойност или брой пациенти
АСАТ U/L	42 20-107
АЛАТ U/L	64 28-188
ГГТ U/L	36 12-174
IL28B С/С С/Т Т/Т	3 пациенти 13 пациенти 4 пациенти
вит. В12 pg/ml медиана, граници	281 150-489
фол. киселина медиана, граници ng/ml	8,1 3,4-16,8

Характеристики	Стойност или брой пациенти
Витамин Д – медиана, граници	62 24-126
Витамин Д – недостатъчност	4 пациенти
достатъчност >75 nmol/L	8
субоптимални нива 50-75 nmol/L	7
недостатъчност 25-50 nmol/L	1
дефицит 15-25 nmol/L	
тотален холестерол	4,72 3,37-6,40

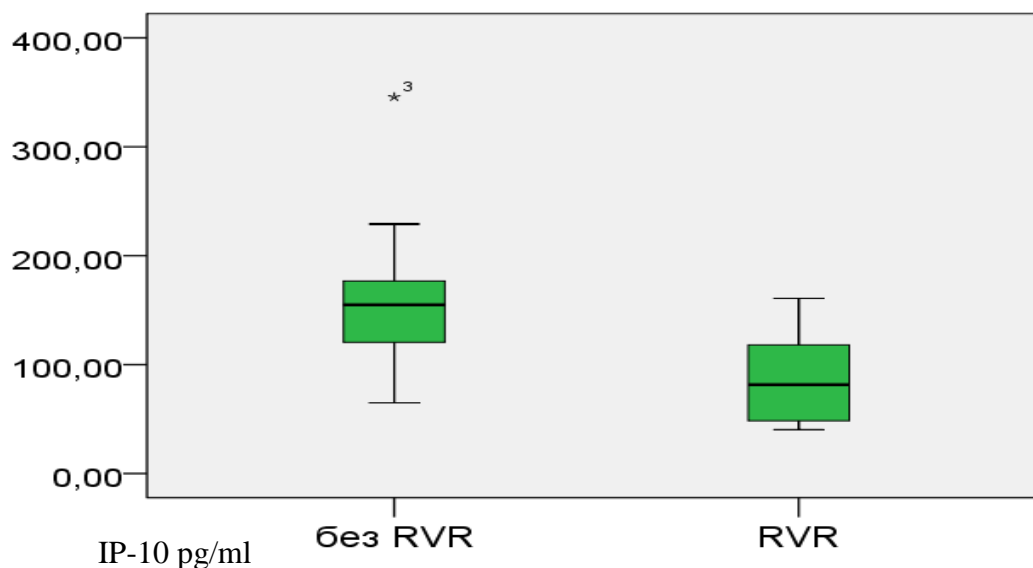
IP-10

Изходни нива на IP-10 са 119 pg/ml (40-345,75) (медиана, граници). Като при пациентите, при които е постигнат RVR – изходните стойности са 81,6 pg/ml (40-160,77), а при пациентите, при които няма RVR – 154,88 (64,9-345,75).

•IP-10 и RVR

Установи се негативна корелация между изходните нива на IP-10 и постигането на RVR ($r = -0,607$; $p = 0.005$). По-високи нива се установиха при пациенти без RVR ($P = 0.007$) (Фиг. 6, Табл. 7).

Фигура 6. IP-10 изходни нива при пациенти с постигант и без постигант



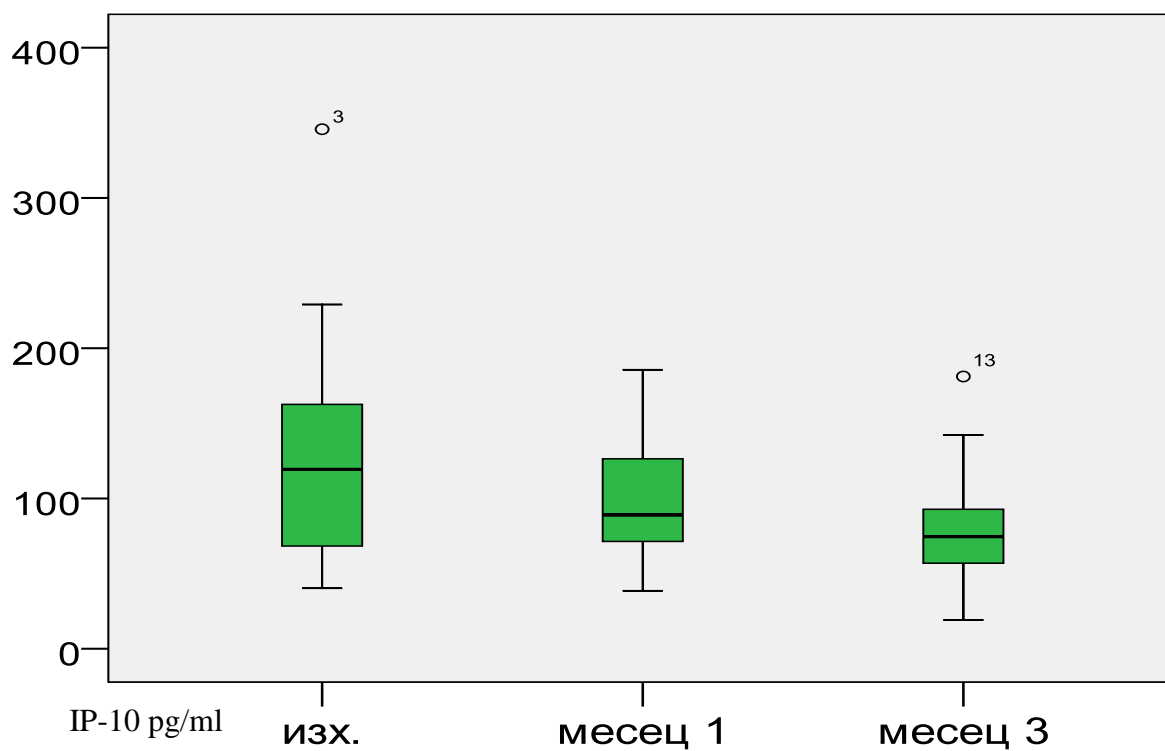
Девет от 10 пациенти, които постигат RVR имат изходни стойности на IP-10 под 150 pg/ml.

По време на противовирусното лечение серумните нива на IP-10 спадат прогресивно с повече от 50% на третия месец, в сравнение с изходните при пациентите, които не постигат RVR, но с EVR в последствие (Табл. 7, Фиг. 7). Докато при пациентите с RVR нивата остават сравнително стабилни (медиана <150 pg/ml).

Таблица 7. IP-10 в хода на стандартна двойна терапия при пациенти с хроничен хепатит С, генотип 1.

	IP-10 изходни/pg/ml медиана, границы	IP-10 1-ви месец медиана, границы	IP-10 3-ти месец медиана, границы	P /изх.-3 месец /
Пациенти с RVR	81,64 40-160,77	83,38 38,6-185,69	74,63 30,69-114,15	0.241
Пациенти без RVR	154,88 64,9-345,75	106,87 65,48-158,29	73,17 19-181,18	0.005

Фигура 7. IP-10 по време на противовирусното лечение при 20-те проследени пациенти с хронична HCV инфекция



Не се утановява корелация между изходните стойности на IP-10 и постигането на ТВО. Установява се, обаче корелация между нивата на IP-10 на 12-та седмица и постигането на ТВО ($p=0.003$, $r=0.641$). Като пониските стойности на 12-та седмица се асоциират с постигане на ТВО.

Има статистически значима разлика между IP-10 на 12 седмица при пациентите със ТВО и без ТВО ($p=0.005$).

Нивата на IP-10 -12-та седмица при пациентите без ТВО са 94,09 pg/ml (61,42-142,30) (медиана, граници), а на 12-та седмица при пациентите с ТВО – 65,64pg/ml (19,26-92,56) (медиана, граници).

•IP-10 и GGT

Подобна динамика се наблюдава при стойностите на GGT. При пациентите без RVR се наблюдава значим спад на третия месец спрямо изходните $p=0.005$.

Установи се корелация между изходните стойности на IP-10 и GGT ($r=0.575$; $p=0.008$).

•IP-10 и вирусен товар

При 14 от 20-те пациенти с хронична HCV инфекция изходните нива на IP-10 бяха под 150 pg/ml, а при останалите 6 пациенти са между 150 и 400 pg/ml. HCV RNA изходни нива бяха под 400 000 IU/ml при 13 пациенти и над 400 000 IU/ml при 7.

При 10 от 14-те пациенти с IP-10 под 150 pg/ml, HCV RNA изходните нива бяха под 400 000 IU/ml. При 3 от 6 пациенти с IP-10 нива над 150 pg/ml, HCV RNA изходни стойности бяха над 400 000 IU. Но не се установи статистически значима корелация между вирусния товар и IP-10.

•IP-10 и други изходни показатели

Не се установява статистически значима разлика в изходните нива на вит Д., вит. В12, фолева киселина, GGT, ALAT, липидния профил и BMI в зависимост от нивото на IP-10 /под 150 pg/ml и над 150 pg/ml. Въпреки, че 10 от 12 пациенти с нормално тегло имат стойности на IP-10 под 150 pg/ml.

Установиха се значими корелации между изходните стойности на IP-10 с изходни стойности на ASAT и GGT (Табл. 8). Не се установи корелация между изходните нива на IP-10 и пола, възрастта, изходни стойности на ALT, нивата на витамин В 12, фолиева киселина, витамин Д, компонентите на липидния профил, хистологична активност и степента на фиброза.

Таблица 8. Корелация между IP-10 /изходни стойности/ и други параметри.

Корелация на изходни нива на IP-10 със следните показатели	P
АСАТ	0.024* r=0.530
ГГТ	0.008* r=0.575
АЛАТ	>0.05
Фолиева киселина	>0.05
Серумни нива на витамин В12	>0.05
Серумни нива на витамин D	>0.05
LDL	>0.05
HDL	>0.05
TG	>0.05
ИТМ	>0.05

IL28 В и IP-10

Не се установява корелация между IL28В генотипа и нивата на IP-10 (изходни, 4 седмица и 12 седмица), $p > 0.05$.

Петима пациенти с напреднала HCV свързана чернодробна болест.

Изходните характеристики на пациентите са показани в табл. 9.

Таблица 9. Изходни характеристики на пациентите.

характеристика	
Брой пациенти	5
Възраст – медиана, граници	63 години /60-71/
Мъже/жени	2/3
Чернодробна цироза (Child A)	4/5 пациенти
Високостепенни варици на хранопровода (3-4ст)	1 пациент
Вирусологичен отговор на предишна стандартна двойна терапия	
Рецидив	2 пациенти
Без отговор	3

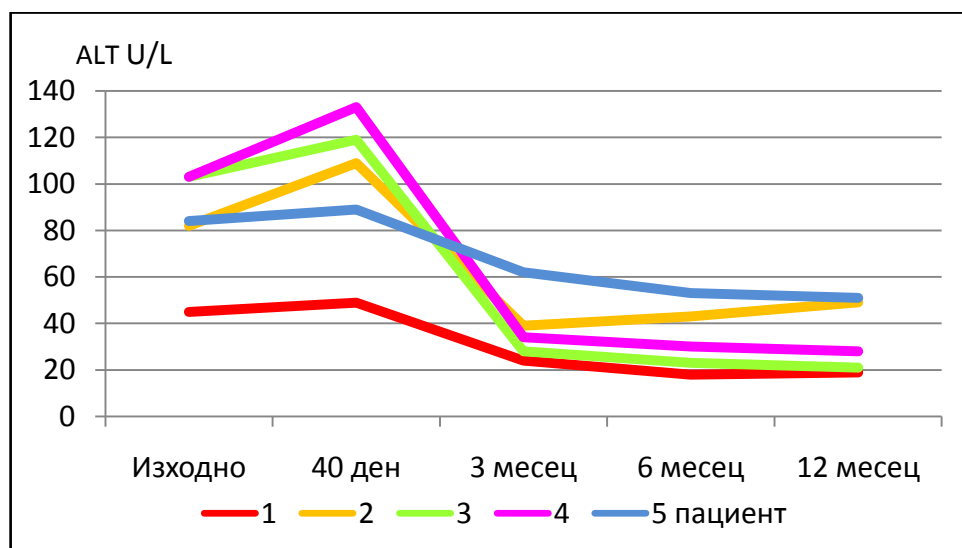
Изходните нива на HCV RNA, ALT и IP-10 са показани в табл.10. Всички пациенти имаха високи нива на IP-10 ($>150\text{pg/ml}$) и повишени аминотрансферази.

Таблица 10. Изходни нива (медиана) на HCV RNA, ALT и IP-10 при проследените 5 пациенти.

	Изходни нива, медиана, граници
HCV RNA IU/ml	895 000 /66500-2 840 000/
ALT IU/ml	84 /45-103/
IP-10 pg/ml	365 /274-501/

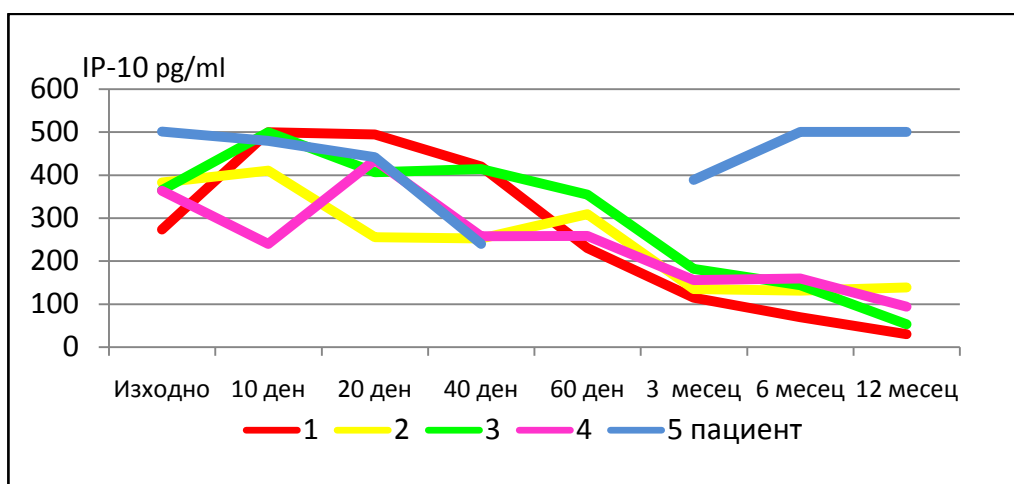
По време на лечението наблюдавахме първоначално леко повишаване на АЛАТ на 40-ти ден при всички пациенти ($p=0.043$). При 4/5 пациенти нивата на АЛАТ намаляват в последствие и влизат в нормални граници на 3 месец ($p=0.043$). При последния пациент нивата на АЛАТ се понижават, спрямо изходните, но не достигат нормални стойности (фиг.8.). Установява се статистически значима разлика между изходните нива на АЛАТ и тези на 12-ти месец ($p=0.042$) общо при 5-мата пациенти. Нивата на ГГТ се понижават също при първите 4-ма пациенти и остава непроменени при последния. Последният пациент е с чернодробна цироза – компенсирана Чайлд А с тежка портална хипертония /високо-рискови варици на хранопровода, лигирани няколко пъти/.

Фигура 8. Серумни нива на АЛАТ по време на терапевтичния режим



По време на лечението с посочената схема нивата на IP-10 се увеличават от (7 до 82%) на 10-20 при 4 от 5-те пациенти (като при 3-ма увеличението беше на 10-ти ден и при един – на 20-ти ден). След това наблюдавахме тенденция към намаляване (при същите 4 пациенти) на 40-ти -60-ти ден. Статистически значима разлика се установява между изходните нива и тези на 3 месец (P 0.043). На 12-ти месец понижението на нивата спрямо изходните е с повече от 50% (от 64 to 89%) (P=0.043). При последния пациент имаше редукция на 60-ти ден, но като цяло нивата остават стабилни по време на лечението (Фиг.9).

Фигура 9. IP-10 нива по време на Isoprinosine – Ribavirin терапевтичния режим при проследените 5-ма пациенти

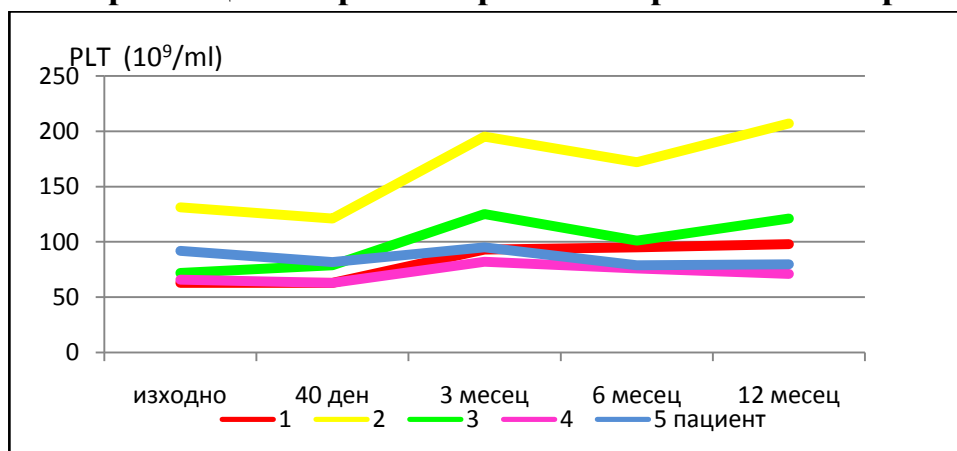


Нивата на HCV RNA флукутират по време на терапията. Не се установява статистически значима разлика между изходните нива и тези на 12-ти месец ($p > 0.05$).

За същия период се наблюдава редукция на хемоглобина (изходно – 12-ти месец) ($P = 0.043$). Като анемия се появи при 3 пациенти. Установихме позитивна корелация между изходните стойности на тромбоцитите и

нивата на IP-10 ($P=0.037$, $r=0.900$). Не се установи корелация между изходните нива на IP-10 и тези на GGT, HCV RNA, ALT, Hgb. По-време на лечението броят на тромбоцитите нарастват, с изключение на 5-ия пациент, където остават ниски (фиг.10).

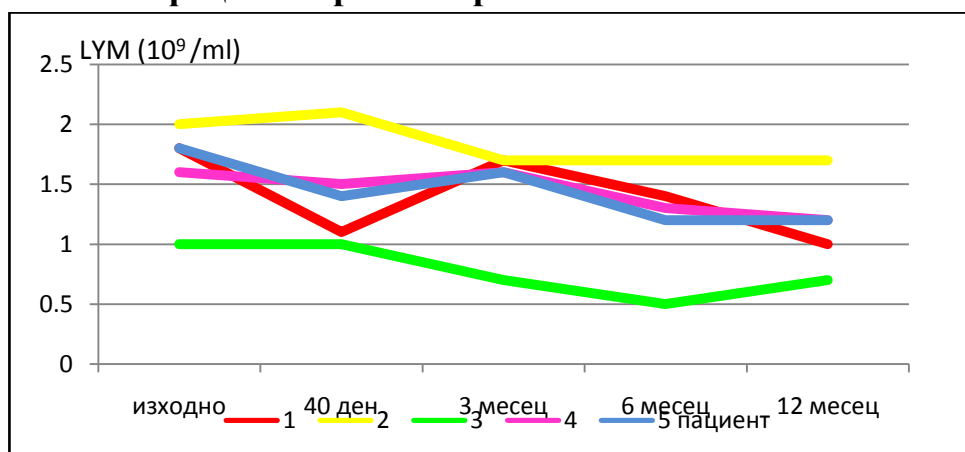
Фигура 10. Тромбоцитен брой по време на терапевтичния режим



Всички пациенти имаха нормални стойности на албумин, преди лечението, без значими промени по време на проследяването.

При двама пациенти се наблюдава леко увеличение на пикочната киселина. При един пациент (жена) се прояви лимфопения, но без инфекциозни или други усложнения (фиг.11). Увеличаването на пикочната киселина се свързва с метаболизма на инозиновата молекула. Рибавирин също може да доведе до увеличаване на нивата на пикочната киселина в серума, дължащо се на неговия метаболизъм и на хемолизата на еритроцитите (Кратка характеристика на продукта).

Фигура 11. Лимфоцитен брой по време на лечението



3. Допълнителни метаболитни показатели (витамин Д, фолати, витамин В 12, липиди) и значението им за терапевтичния отговор при пациенти с хронична HCV с ненапреднало чернодробно увреждане

Всички 20 пациенти са с нормални изходни стойности на фолиева киселина. Само при един от пациентите, който в последствие постига RVR и един пациент, който не постига RVR, имат леко изразен дефицит на витамин В12.

Разпределението на нашите пациенти спрямо отговора на лечение, пола и нивата на витамин Д са показани на таблица 11.

Таблица 11. Серумни нива на витамин Д, спрямо отговора на лечение и пола на пациентите.

Витамин Д	RVR		Пол	
	без RVR	с RVR	Мъж	жена
Достатъчност 80-200 nmol/L	4	0	2	2
Лека недостатъчност 50-79,9 nmol/L	3	5	4	4
Изразена недостатъчност 25-49,9 nmol/L	3	4	4	3
Дефицит 0-24,9 nmol/L	0	1	0	1
тежък vit D дефицит < 15 nmol/L	0	0	0	0

Повечето от нашите пациенти (16/20) са със субоптимални нива или недостатъчност, които не са свързани с отговора. Още повече, 4 пациенти,

с достатъчност, в следствие не постигат RVR. Не се установява значима корелация между нивата на витамин Д и постигане на RVR ($p=0.241$) и TBO ($p=0.844$).

Липиден профил

LDL. Медианата на изходните нива е **2,74 mmol/l (1,65-4,17)**. При 7 от 20-те пациенти се установяват стойности на LDL над нормата /3mmol/l/, като 6 от тях са мъже. Установява се корелация на стойностите на LDL с пола, като при мъжете – те са по-високи ($p=0.014, r=0.538$). Има и статистически значима разлика между стойностите на LDL при мъже и жени / $p=0.019$ / По-високи са стойностите на TG и VLDL при мъжете ($p=0.023$), в сравнение с жените, като при жените стойностите на HDL са по-високи ($p=0.005$). Не се установява корелация между LDL, HDL, VLDL и TG с отговора към терапия /RVR/ / $p=0.05$ /, нито с TBO ($p>0.05$). Не се установява разлика в стойностите при пациенти с постигнат RVR и без RVR.

4. Серумните нива на IP- 10 и промяната им при стандартната терапия на хронична HBV инфекция с нуклеозидни аналози или Peg-interferon-alfa-2a.

При 19 пациенти с хронична HBV инфекция на терапия с NUC и при 10 от проследените пациенти с хронична HBV инфекция на терапия с Peg-INF-alfa 2a (от група II) бяха проследени нивата на IP-10 изходно и 3 месец (табл.12).

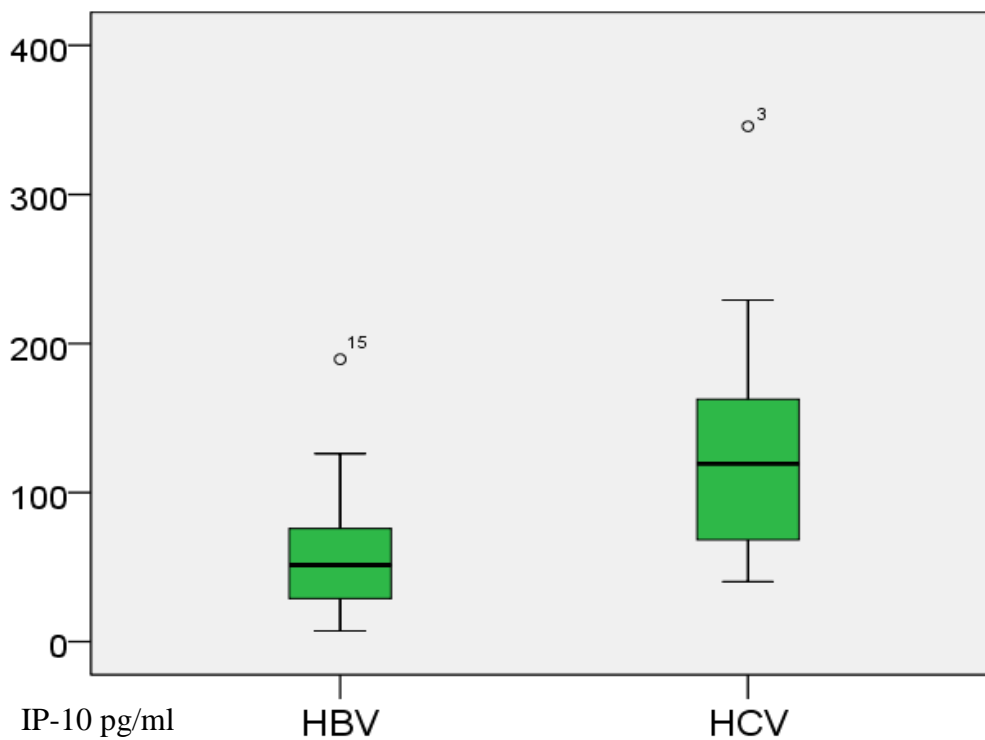
Таблица 12. Нива на IP-10 (медиана, граници) при пациенти с хроничен хепатит HCV или HBV (непараметричен анализ – между периодите на проследяване в отделните групи).

Група пациенти/ IP-10 pg/ml серумни нива	IP-10 pg/ml – изходни нива Медиана, граници	IP-10 pg/ml 3-ти месец Медиана, граници	p (Wilcoxon- непараметричен анализ)
20 пациенти с хронична HCV инфекция	119,32 40,24-345,75	74,63 19,26-181,18	0.003*
19 пациенти с хронична HBV инфекция на лечение с NUC	51,54 7,19-189,45	42,12 20,96-108,05	0.398
10 пациенти с хронична HBV инфекция на лечение с Peg-IFN alfa 2a	72,20 35,01-382,38	67,02 10,66-418,68	0.799
Общо пациенти с хронична HBV инфекция с изследвани нива на IP-10	64,03 7,19-382,38	45,72 10,66-418,68	0.770

Не се установява корелация между изходните стойности на IP-10 и стента на фиброза, както при пациентите с хронична HBV. Няма корелации и между изходните и на трети месец стойности на IP-10 със съответно стойностите преди лечение и на трети месец на HBV DNA, ALT, HBsAg (и при пациентите на терапия с NUC и ИФН). Не се установява статистически значима разлика между изходните стойности на IP-10 при HBeAg +/- и +/- пациенти, както и между пациенти с негативна вiremия на трети месец и такива с налична вiremия. Няма статистически значима разлика при пациенти с цироза и пациенти с ХХВ (при пациентите на терапия с NUC).

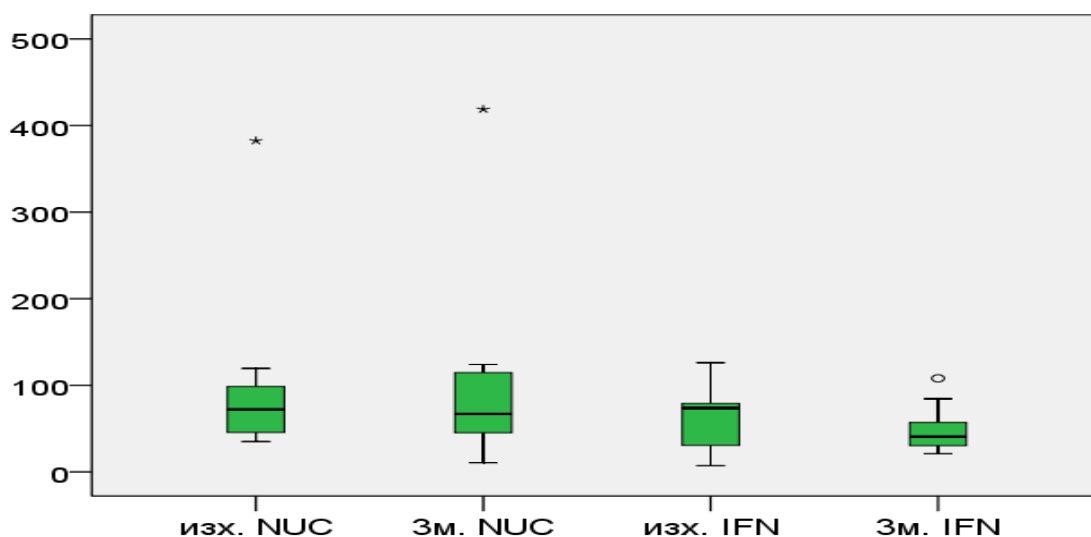
Изходните нива на IP-10 при пациентите с С хепатит (20-те пациенти) са 2 пъти по-високи от тези при пациентите с хронична В инфекция (p=0.002) (фиг.12).

Фигура 12. Изходни нива на IP-10 при пациенти с хронична HBV и HCV инфекция



Като при пациентите с хронична В инфекция, няма статистическа промяна на нивата на 3-ти месец, спрямо изходните, както при пациентите на терапия с интерферон, така и на терапия с NUC (табл.12, фиг.13).

Фигура 13. IP-10 по време на лечение с IFN или NUC



5. Количествен HBsAg при HBeAg-позитивни и HBeAg негативни пациенти, провеждащи терапия с нуклеозидни аналози или Peg-interferon-alfa-2a.

При 20 пациенти, с хронична HBV инфекция, при които се започна терапия с NUC изследвахме количествен HBsAg – изходно, 3 и 12-ти месец.

Таблица 13. Изходни характеристики на пациентите с хронична HBV инфекция на лечение с NUC.

	HBe-позитивни	HBe-негативни
Брой пациенти	9	11
Възраст - медиана, граници	37 (29-60)	47 (34-63)
Male /female (n)	6/3	10/1
АЛТ U/L– медиана, граници	40 (25-185)	79 (17-482)
HBV DNA IU/ml – медиана, граници	11 842 000 (6 654-496 000 000)	1 110 000 (279-32 115 000)
количествен HBsAg IU/ml – медиана, граници	9319 /1724-311 150/	2683 /174-12140/
Чернодробна хистология /METAVIR/:		
Хроничен хепатит /F 0-3/	5	7
	HBe-позитивни	HBe-негативни
Без ЧБ /чернодробна цироза – Чайлд A/	3	2
Без ЧБ /хроничен хепатит/	1	2
НУК терапия:		
Tenofovir /брой пациенти/	5	3
Entecavir /брой пациенти/	3	7
Telbivudine /брой пациенти/	1	1

Чернодробна биопсия (по Mengini метод) – преди лечението е проведена при 12 от 20-те и е оценена по METAVIR системата. Петима пациенти, при които не е проведена чернодробна биопсия са с клинични и ехографски белези за чернодробна цироза (F4), докато останалите 3-ма без чернодробна биопсия са с хроничен хепатит.

Изходните нива на HBsAg при HBeAg-позитивните пациенти бяха три пъти по-високи в сравнение с HBeAg–негативните пациенти (Табл.14).

Таблица 14. Изходни нива на HBV DNA, АЛАТ и количествен HBeAg-позитивни пациенти и HBeAg–негативни пациенти.

Показател медиана, граници	HBeAg (+)	HBeAg (-)	p*
HBV DNA [IU/ml]	11 842 000 (6654 –496 000 000)	1 110 000 (279-32 115 000)	0.152
HBsAg [IU/ml]	9319 (1721-311 150)	2683 (174-12 140)	0.002
АЛАТ [U/L]	40 (25-186)	79 (17-482)	0.552

*Mann-Whitney–непараметричен анализ

Резултати при HBeAg (+) пациенти

Нивата на количествения HBsAg, HBV DNA и ALT изходно и по време на лечението с NUC при HBeAg (+) пациенти са представени на таблица 15.

Таблица 15. Количествен HBsAg, HBV DNA и ALT – изходни нива и по време на лечението с NUC при HBeAg (+) пациенти.

П а ц и е н т	HBsAg IU/ml изходно	HBsAg IU/ml 3-ти месец	HBsAg IU/ml 12-ти месец	ALT U/L изх.	ALT U/L 3-ти месец	ALT U/L 12-ти месец	HBV DNA IU/ml изходно	HBV DNA IU/ml 3-ти месец	HBV DNA IU/ml 12-ти месец
1	43460	34573	8390	40	34	64	496000000	134000	471
2	1721	1798	2606	38	49	33	6654	0	0
3	4468	4609	3501	53	42	30	523000	41	0
4	32516	15851	102	186	27	24	294000000	980	0
5	311150	134580	17248	91	100	38	288800000	15200	0
6	6792	5978	5238	38	32	25	295000	0	0
7	46332	27027	37323	40	16	14	11842000	0	0

П а ц и е н т	HBsAg IU/ml изходно	HBsAg IU/ml 3-ти месец	HBsAg IU/ml 12-ти месец	ALT U/L изх.	ALT U/L 3-ти месец	ALT U/L 12-ти месец	HBV DNA IU/ml изходно	HBV DNA IU/ml 3-ти месец	HBV DNA IU/ml 12-ти месец
8	8346	10897	12044	25	29	29	240400000	114	0
9	9319	11474	7596	27	29	22	12600	0	0
Мед.	9319	11474	7596	40	32	29	11 842 000	41	0

Установи се статистически значима корелация между изходните стойности на HBsAg и HBV DNA ($r=0.683$; $p=0.042$, Spearman), но няма корелация между изходните нива на HBsAg и ALT ($p>0.05$).

По време на лечението серумните HBV DNA нива прогресивно намаляват при всички пациент и достигат до неустановими нива на етап от лечението 3, 6, 9 и 12-ти месец при съответно 4/9, 6/9, 8/9 и 8/9 от пациентите. Не беше наблюдавана нито HBeAg-загуба, нито HBsAg-загуба или сероконверсия.

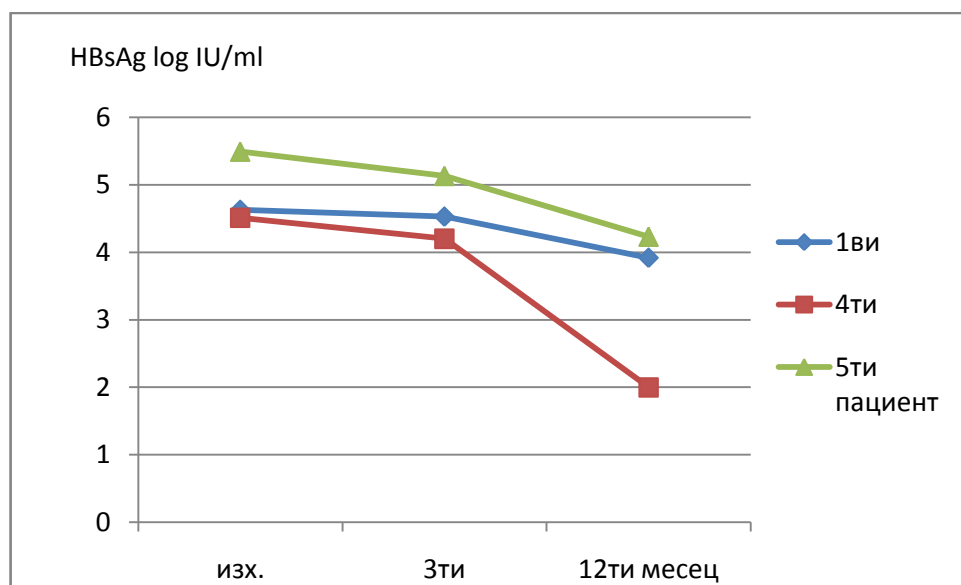
Кинетиката на серумните нива на HBsAg се различава от бързата кинетика на серумните нива на HBV DNA по време на терапията с NUC. Три месеца след започване на лечение с NUC нивата на HBsAg се увеличават с около 20% при двама пациенти и остават относително непроменени при 3-ма пациенти. Понижаване с най-малко 20% се наблюдава при 4/9 от пациентите.

На 12-ти месец от лечението, при 6-ма от HBeAg-позитивните пациенти се наблюдава понижаване на нивата на HBsAg нивата с най-малко 20% в сравнение с изходните. Наблюдавахме следните модели на промените в нивата на HBsAg:

• **Бърз спад** ($> 20\%$ на 3^{ти} месец и $> 0,5 \log_{10}$ IU/ml на 12^{ти} месец) се установи при 3-ма пациенти (1^{ви}, 4^{ти} и 5^{ти} пациент; Табл. 15, фиг.14). При

2-ма от тях понижението е с $>1 \log_{10} \text{ IU/ml}$. Изходните характеристики на тези двамата пациенти (№4 и №5) са: мъжки пол, възраст под 40 години, лека степен на чернодробно увреждане, висок вирусен товар (около $8,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$), с изходни нива на HBsAg level $>4,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$, и повишени нива на АЛАТ (2,3 до 4,6 пъти над горна граница). Третият пациент (№1), при когото редукцията на HBsAg е $> 0,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$, но $< 1 \log_{10} \text{ IU/ml}$: е 60 годишна жена с напреднала фиброза (F3), висок вирусен товар (над $8,5 \log_{10}$), HBsAg $>4,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$ нормални стойности на ALT.

Фигура 14. Бърз спад на HBsAg ($>0,5 \log \text{ IU/ml}$ на 12-ти месец) при пациент №1, 4, 5



• **Бавен спад** ($> 20\%$, но $< 0.5 \log_{10} \text{ IU/ml}$ на 12^{ти} месец) се установи при 2-ма пациенти (№3 и №6) – Табл. 15

• **Бавно покачване** (непрекъснато леко покачване с $>20\%$ на 12^{ти} месец) се установи при 2-ма пациенти (№2 и №8) – Табл. 15. При единия от тях имаше ранно повишаване на HBsAg на третия месец (№8).

• **Флукутуиране на HBsAg** беше наблюдавано при 2-ма пациенти (№7 и 9); Табл. 15). При единия пациент количествения HBsAg първоначално се

понижава на 3^{ти} месец и в последствие се повишава на 12^{ти} месец. При втория случай HBsAg се повишава на 3^{ти} месец и се повишава на 12^{ти} месец. И при двамата пациенти, независимо от флукуацията се наблюдава редукция на HBsAg нивата с най-малко 20% на 12^{ти} месец спрямо изходните.

Резултати при HBsAg (-) пациенти

Изходните нива на количествения HBsAg, HBV DNA и ALT и по време на лечението с NUC при HBeAg(-) пациенти са показани на табл. 16.

Таблица 16. Количествен HBsAg, HBV DNA и ALT – изходни нива и по време на лечението с NUC при HBeAg (-) пациенти.

Пациент	HBsAg IU/ml изх.	HBsAg IU/ml 3-ти мес.	HBsAg IU/ml 12-ти мес.	ALT U/L изх.	ALT U/L 3-ти мес.	ALT U/L 12-ти мес.	HBV DNA IU/ml изх.	HBVDNA IU/ml 3-ти мес.	HBV DNA IU/ml 12-ти мес.
1	3943	4339	4266	157	24	21	2430000	538	0
2	259	238	228	17	13	12	2148	0	0
3	2847	4606	3354	172	29	19	336500	0	0
4	12140	10118	10869	45	45	33	32115000	75700	0
5	2092	2072	2056	81	17	16	294000	0	0
6	4168	3512	4015	79	25	17	1430000	136	0
7	4167	4109	2873	38	28	34	1009	47	0
8	1128	4278	4398	140	23	15	1250000	34	0
9	1425	1738	1736	482	27	18	5888000	1730	0
10	174	151	126	35	23	21	1110000	0	0
11	2683	2780	2634	23	34	18	279	0	0
Мед	2683	3512	2873	79	25	18	1 110 000	34	0

При HBeAg (-) пациенти няма статистически значима корелация между изходните нива на HBsAg и HBV DNA, както и между изходните нива на HBsAg и ALT.

По време на лечението нивата на HBV DNA прогресивно се понижават при всички пациенти и стават неустановими на 3, 6, 9 и 12^{ти} месец от лечението при 5/11, 9/11, 10/11 и 11/11 от пациентите съответно. Не се установи HBsAg-загуба при нито един от пациентите (табл.16).

На 3^{ти} месец от лечението, HBsAg се покачва при 3/11 от HBeAg-негативните пациенти с 10 до 280% и остават подобни на 12^{ти} месец.

На 12^{ти} само при един пациент (№7, Табл. 16) се наблюдава слабо понижаване на HBsAg спрямо изходните нива, но не $\geq 0.5 \log_{10}$ IU/ml. Останалите 10 HBeAg-негативни пациенти остават със стабилни нива на HBsAg в сравнение с изходните или тези на 3^{ти} месец (Табл. 16).

При всички 20 пациенти (HBeAg-позитивни и HBeAg-негативни) не се установява статистически значима разлика между изходните нива на HBsAg и тези на 12^{ти} месец, както и в отделните групи HBeAg-позитивни и HBeAg-негативни (Wilcoxon, $p > 0.05$). Не се установява статистически значима разлика между изходните нива на HBsAg при пациентите с хроничен хепатит и тези с цироза (в цялата група от 20 пациенти) ($p > 0.05$). Няма корелация между степента на фиброза и нивата на HBsAg. Не се установява статистически значима разлика между HBsAg при пациентите с неоткриваема и откриваема HBV DNA на трети месец от лечение. Няма статистически значима разлика между нивата на HBsAg на 12^{ти} месец от лечението при пациенти лекувани с Tenofovir и Entecavir.

31 пациенти - с ХХВ на лечение с Peg-IFN alfa-2a (табл. 17)

Таблица 17. Изходни характеристики на пациентите на лечение с Peg-IFN alfa-2a.

	Всички	HBe-позитивни	HBe-негативни
Брой пациенти	31	5	26
Възраст - медиана, граници	35 21-55	30 22-41	35,5 21-55
Мъже /жени (бр.)	26/5	5/0	21/5
АЛАТ U/L– медиана, граници	66 30-268	100 36-240	58,5 30-268
HBVDNA IU/ml – медиана, граници	443800 1750-337 800 000	11 900 000 38 270-337 800 000	202 100 1750-9 420 000
количествен HBsAg IU/ml – медиана, граници	7134 128-139800	36399 788-139 800	5470 128-76002
Чернодробна хистология /METAVIR/:			
F0	0	0	0
F1	14	1	13
F2	13	3	10
F3	3	1	2
Чернодробна цироза /F4/	0	0	0
Без ЧБ /хроничен хепатит/	1	0	1

Чернодробна биопсия (по Mengini метод) – преди лечението е проведена при 30 от 31-та пациенти и е оценена по METAVIR системата. При единия пациент, при който не е проведена чернодробна биопсия – няма пациенти с клинични, ехографски или хистологични данни за ЧЦ.

Изходните нива на HBsAg при HBeAg-позитивните пациенти бяха около 6 пъти по-високи в сравнение с HBeAg–негативните пациенти ($p=0.037$) (табл. 17, 18). Изходните стойности HBV DNA при HBeAg-позитивните пациенти също бяха статистически значимо по-високи от тези при HBeAg-негативните ($p=0.016$). Не се установи статистически значима разлика между изходните нива на АЛАТ (табл. 18).

Таблица 18. Изходни нива на HBV DNA, АЛАТ и количествен HBsAg при HBeAg-позитивни пациенти и HBeAg–негативни пациенти.

Показател медиана, граници	HBeAg (+)	HBeAg (-)	p*
HBV DNA [IU/ml]	11 900 000 38 270-337 800 000	202 100 1750-9 420 000	0.016*
HBsAg [IU/ml]	36399 788-139 800	5470 128-76002	0.037*
ALAT [U/L]	100 36-240	58,5 30-268	0.195

*Mann-Whitney–непараметричен анализ

Резултати при HBeAg +/- пациенти на лечение с IFN

Изходните характеристики на HBeAg +/- пациенти са представени в табл.17. Динамиката на HBV DNA, HBsAg и ALT – изходно и в хода на лечението са показани в табл. 19.

Таблица 19. Серумни нива на HBV DNA, АЛТ и количествен HBsAg (медиана, граници) при HBeAg-позитивни пациенти изходно и по време на стандартна IFN терапия.

Показател медиана, границы	изходни стойности	3-ти месец	6-ти месец	9-ти месец	12-ти месец
HBV DNA [IU/ml]	11 900 000 38 270-337 800 000	0* 0 - 341 000 000	0 0-40260	0 0-0	0 0-108 660
HBsAg [IU/ml]	36399 788-139 800	7573 846 – 77308	51 0 - 26961	320 0-17809	196,5 0-11572
ALT [U/L]	100 36-240	133 28 – 168	60 21 - 162	48 18-58	40 20-91

*кратък начин за изобразяване в таблиците на неоткриваема вирусемия.

Трима от HBeAg +/- пациенти негативират HBV DNA още на 3 месец от лечението (пациенти № 1, 2 и 5 от табл. 20), един от останалите пациенти постига ранен вирусологичен отговор, без HBV DNA да е негативна (№4) и при един пациент (№3) няма ранен вирусологичен отговор и терапията беше спряна на 6 месец.

Таблица 20. Серумни нива HBV DNA и HBsAg – изходно и в хода на лечение с IFN при HBeAg-позитивни пациенти.

П а ц и е н т	Изходно		3-ти месец		6 -ти месец		9-ти месец		12-ти месец		6 месеца след края на лече- ние
	HBV DNA IU/ml	HBsAg IU/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg IU/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg IU/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg IU/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg IU/ml	
1	38270	788	0*	846	0	762	0	634	0	393	78 000
2	1 953 200	30910	0	27450	0	26961	0	17809	10866 0	11572	29 540
3	337 800 000	139800	341 000 000	77308	40260	26					
4	118 500 000	78452	4000	7573	0	51	0	6	0	<0,05	**
5	209 000 000	36399	0	5798	0	<0,05	0	<0,05	0	<0,05	**

*Използвано за краткост, вместо неоткриваема HBV DNA

** Терапията е удължена и продължава на този етап, като вирусемията е негативна

Наблюдават се следните модели, според изходните нива на HBsAg, HBV DNA и тяхната динамика (табл.20):

- 1) Ниски изходни нива на HBsAg <1000 и вирусен товар <100 000 IU/ml (пациент №1) - **Леко покачване** на HBsAg на 3 месец (с <10 %) и **негативиране на HBV DNA** на 3 месец и последващ бавен спад на HBsAg (спад на 12 месец с 50%, спрямо изходните). Не се постига ТВО. При проследяване на пациент № 1, 1 година след лечение, HBV DNA беше значимо спаднала – до 80 IU/ml, при нормални аминотрасфери и HBsAg
- 2) Високи изходни нива на HBsAg (>30 000) и на HBVDNA (> 1 000 000 IU/ml)
 - 2.1 **Лек спад** на HBsAg (<10%) на трети месец и **негативиране на HBVDNA** на 3 месец и продължаващ бавен спад на HBsAg (на 12

месец с между 50 и 65%) (пациент 2) – в следствие не се постига ТВО.

2.2 значим спад на HBsAg на 3 месец (с >10%, между 45 и 90%)

- и липса на спад на вирусемията (липса на ранен вирусологичен отговор) (пациент 3). При този пациент терапията беше спряна, тъй като освен липса на отговор на 3-ти месец, нивото на HBsAg на трети месец беше > 1500 IU/ml.

-ранен вирусологичен отговор със или без негативизиране на вирусемията (пациенти №4 и 5). При тях терапията беше удължена (виж по-долу), като при пациент 4 имаше anti-HBs на 12 месец, а при пациент 5 на 15-ти месец.

Резултати при HBeAg +/- пациенти на лечение с IFN

Изходните характеристики на HBeAg/-/ пациенти, преди започване на лечението са посочени в табл. 17.

Таблица 21. Серумни нива на HBV DNA, АЛАТ и количествен HBsAg (медиана, граници) при HBeAg-негативни пациенти изходно и по време на стандартна IFN терапия.

Показател медиана, граници	изходни стойности	3-ти месец	6-ти месец	9-ти месец	12-ти месец
HBV DNA [IU/ml]	202 100 1750-9 420 000	0 0 - 55962	0 0-41926	0 0-298 000	0 0- 21960000
HBsAg [IU/ml]	5470 128-76002	5983 47-49760	3947 0 – 98000	1158 0-24050	2797 0-64160
ALT [U/L]	58,5 30-268	62 12-286	51 14 – 237	40 10-115	29 9-127

Таблица 22. Статистическа разлика между изходните стойности на HBV DNA, АЛАТ и количествен HBsAg и съответно 3, 6, 12 месец на лечение при HBeAg +/- пациенти.

Статистическа разлика (Wilcoxon) p	изх.- 3 месец	изх.- 6 месец	изх.-9 месец	изх.-12 месец
HBV DNA	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
HBsAg	0.313	0.253	0.020*	0.007*
ALT	0.959	0.122	0.003*	0.000*

Половината от HBeAg +/- пациенти (13) негативират HBV DNA още на 3 месец от лечението, а при другата половина има ранен вирусологичен отговор без HBV DNA да е негативна (спад на HBV DNA на трети месец, спрямо изходното ниво, с $> 1 \log_{10}$) (табл.23,24). Установява се статистически значима разлика между изходните нива на HBV DNA и тези на 3, 6, 9 и 12-ти месец ($p < 0.05$). Статистическа разлика се установява между изходните нива на HBsAg и тези на 9 и 12-ти месец (Таблица 22).

За 24/26 от пациентите (останалите не са стигнали този етап) имаме информация за отговора 6 месеца след края на терапия. При 2-ма (№18 и 21) терапията е удължена и още продължава. При 11/24 пациенти има добър отговор 6 месеца след терапията HBV DNA $< 2000 \text{ IU/ml}$ ($< 10\,000 \text{ ср/ml}$) и нормални аминотрасферази и при 6 от тези 11 пациенти HBV DNA е негативна (табл.23,24).

При пациент №15 терапията беше спряна на 6-ти месец, поради сериозна странична реакция – генерализиран обрив.

При проследяване динамикта на HBsAg, може да се набележат следните тенденции:

- 1) Увеличаване на нивата на 3 месец, спрямо изходните ($> 10\%$) - 9 от 26-мата пациенти
- 2) Без промяна на 3 месец (до 5%) - 2-ма

- 3) Понижаване на 3 месец, спрямо изходните: 14 пациенти
 -5-9,99% - 2 пациенти
 -10-29,9% - 3 пациенти
 -30-49,9 -6 пациенти
 -50 и > -3 пациенти

При един от пациентите (№26) няма информация за изходните нива на HBsAg.

Спрямо последваща промяна (след 3 месец) се наблюдават следните тенденции:

- 1) Понижава се от 6 месец, спрямо 3 месец и в последствие продължава да пада бавно и леко или флукутира -11 пациенти
- 2) Повишава се на 6 месец, спрямо 3 м и лек спад или флукутира – 6 пациенти
- 3) Спада след 3-ти месец и на 12 месец спада, спрямо изходното ниво е с 90 и >90% -8 пациенти

А. HBeAg- негативни пациенти с редуция на HBsAg на трети месец, спрямо изходните нива (табл. 23)

Таблица 23. Серумни нива на HBV DNA и HBsAg изходно и по време на лечението с Peg-IFN при HBeAg-негативни пациенти с редуция на HBsAg на третия месец.

п а ц.	Изходно		3-ти месец		6-ти месец		9-ти месец		12-ти месец		6 месеца след края на лечение
	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	
2	1750	76002	0*	49760	0	98000	0	24050	0	64160	9500
3	519231	11312	577	3251	0	1046	0	810	136	806	0

п а ц.	Изходно		3-ти месец		6-ти месец		9-ти месец		12-ти месец		6 месеца след края на лечение
	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	
7	30200	10590	221	5458	0	1714	0	1158	0	813	1220
8	3 090 000	11057	3110	8337	25	376	0	15	0	<0,05	**
13	337000	8448	0	5913	0	530	0	373	0	394	0
16	59800	47744	599	41300	430	61941			464	56309	4056
17	3560	1007	3520	551	759	893	582	910	0	1036	8968
18	714000	535	0	187	0	76	0	79	0	52	**
19	21100	859	0	572	0	<0,05	0	<0,05	0	<0,05	**
20	1 862 000	312	0	282	0	256	0	106	1995	321	1472
21	674000	1866	0	1135	0	14	0	1,33	0	<0,05	**
22	2460	29997	193	27060	577	16676	0	19525	0	16511	143
23	67200	268	0	47	0	14	0	<0,05	0	<0,05	0
25	3 340 000	11376	1858	10010	0	10187	0	10994	0	9611	53580

*използвано за кратко, вместо неоткриваема

**терапията е удължена

При един от пациентите със спад на HBsAg с повече от 90%, спрямо изходните нива – няма отговор в края на терапия (ЕОТ) – налице е виремия. Това пациент № 3 от таблица 23. Шест месеца след лечение и при проследяване 2 години след лечение HBsAg беше <0.05, а HBV DNA – негативна. На третата година след лечение – HBV DNA беше негативна и имаше налични anti-HBsAg – 20 IU/ml.

При 3-ма от тези 8 пациенти, при които има спад на 12 месец с повече от 90%, спадането на HBsAg на третия месец, спрямо изходното ниво е с 50% или повече е от 50% (пациент № 3, 18, 23). При 4-ма този спад на трети месец е между 30-49,9% (пациент №7, 13, 19, 21) и при 1 пациент - 10-

29,9% (№ 8). При 3 от тези 8 пациенти изходните нива са били под 1000 IU/ml, при 2-ма – 1000-10 000 и при 3-ма >10 000.

При 4-ма от 14-те пациенти, при които има спад на 3-ти месец, на 6-ти месец има повишаване, а в последствие спад или флукутация, а при двама от 14-те пациенти има понижаване на 6 месец и в последствие флукутиране.

При 6/14 HBeAg –негативните пациенти с понижаване на HBsAg на трети месец, има вирусологичен отговор 6 месеца след края на терапията (HBV DNA < 2000 IU/ml) и при 3-ма от тези 6 HBV DNA е негативна. Една година след лечение – HBV DNA беше < 2000 IU/ml при същите 6 пациенти, като при 4-ма беше негативна.

При 4/14 терапията беше удължена, като при 2-ма терапията продължава и в настоящия момент (описано в глава 6.), а при другите 2-ма HBV DNA е негативна след спиране на удължената терапия.

В. HBeAg- негативни пациенти с повишаване или липса на промяна на HBsAg на трети месец, спрямо изходните нива (табл. 24)

Таблица 24. Серумни нива на HBV DNA и HBsAg изходно и по време на Peg IFN лечението при HBeAg-негативни пациенти, с повишаване или липса на промяна на HBsAg на третия месец.

п а ц.	Изходно		3-ти месец		6-ти месец		9-ти месец		12-ти месец		6 м. след края на лечение
	HBV DNA IU/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA IU/ml	HBsAg UI/ml	
1	7770 000	5820	55 962	12648	41 923	10103	29 8000	8311	219 600 00	8872	6 800 000
4	24500	4754	41	4705	0	3976	0	3155	0	2797	12000 000

п а ц.	Изходно		3-ти месец		6-ти месец		9-ти месец		12-ти месец		6 м. след края на лечение
	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	HBV DNA UI/ml	HBsAg UI/ml	
5	43800	5470	0*	6268	30	6776	0	5796	0	4231	38000
6	1390000	4148	0	4346	0	1417	0	92	0	55	37 000**
9	30080	128	0	435	0	221	0	366	0	390	1181
10	9420000	11643	36300	13000	10300	11612	742	11328	0	10605	968 000
11	443800	9482	28	10555	0	10186	0	9915	0	8470	6440000
12	1312000	4528	244	6053	0	6299	0	4926	0	3845	0 5492***
14	8390	4016	0	4674	0	3919	0	6099	10564	4990	55800
15	2030	4958	0	6956	0	4066					700
24	1570000	11957	4720	13464	15444	13476				12419	2 970 000

*използвано за кратко, вместо неоткриваема

** 9 месеца след края на лечение

*** 18 месеца след края на лечение

При 9/26 пациенти има повишаване на HBsAg на третия месец. При 7 от 9-те пациенти, при които има повишаване на HBsAg на 3-ти месец, на 6-ти месец има лек спад, спрямо 3-месец и последващите месеци флукутации, без значително понижаване на 12 месец, а при 2-ма – леко понижаване на 6 месец и последващи флукутации. т.е при всички пациенти, при които има повишаване на 3 месец, няма последващо значимо понижаване на HBsAg и постигане на добър терапевтичен отговор след спиране на терапията или поява на анти HBsAg (табл.24). При пациент № 12 – шест месеца след лечението HBV DNA е неоткриваема, но 12 месеца след края на терапия - 489 IU/ml и 18 след края – 5492 IU/ml. При пациент №26, без изходна стойност на HBsAg – по време на лечението нивата са без значима промяна (8800-8600-9100-9130), и 6 месеца след лечението HBV DNA беше 2108 IU/ml.

Нито един от HBeAg – негативните пациенти не изпълнява т.нар. „правила за спиране”, съобразно HBsAg и HBV DNA на трети месец (терапията трябва да бъде прекратена при наличие на двете условия – липса на каквото и да е понижаване на HBsAg и липса на спад на HBV DNA с $<2 \log$). От пациентите със спад на HBsAg на трети месец – при двама от тях спада на вирусемията на трети месец е с по-малко от $2 \log$, но е налице спад на HBsAg на трети месец (№ 17 и 22).

При 6/9 пациенти с повишаване на HBsAg на трети месец, изходните нива на HBsAg бяха между 1000-10000 IU/ml при 2/9 - >10000 и при 1/9 patients - <1000 .

При 2-ма от пациентите, които няма промяна на 3-ти месец, изходните нива са между 1000-10000, при 2-ма са >10000 и при 1 - <1000 . При двамата пациенти, при които няма промяна на 3-ти месец – изходните нива са между 1000-10000.

Не се установява статистически значима разлика на изходните нива на HBsAg и HBV DNA при пациентите, които в последствие понижават или повишават нивата на HBsAg на 3 месец. Не се установява статистически значима разлика на изходните нива на HBsAg и HBV DNA, при пациентите, при които има спад на HBsAg на 12 месец $>90\%$, и тези при които няма (съответно $p=0.251$; $p=0.263$). Установява се статистическа разлика между нивата на HBsAg на трети месец при пациентите със значим спад с $>90\%$ на 12-ти месец, спрямо тези без спад с $>90\%$ ($p=0.011$). Като при пациентите, при които в последствие има значим спад на HBsAg с $>90\%$ на 12-ти месец, серумните нива на HBsAg на трети месец са 4 пъти по-ниски от съответните нива при пациенти без понижаване с $>90\%$ (2193 медиана, граници 47-8337; срещу 8448 –

медиана, 282-49760 граници). Установява се значима позитивна корелация между наличието на спад на HBsAg на трети месец и наличието на значим спад с > 90% на 12-ти месец (p=0.013, r=0.488) и постигането на добър отговор след края на терапия (p=0.033, r=0.446) и респективно между наличие на значим спад на 12-ти месец и постигане на добър отговор след лечение (p=0.001, r=0.639).

При един от пациентите, при които няма промяна на 3 месец (№6)– в последствие на 12 месец има спад с повече от 90%, а при другия пациент (№4) в последствие има лек и бавен спад.

Пациенти с хроничен HBeAg +/- хепатит В на комбинирана терапия NUC –Peg-IFN-alfa 2a

Таблица 25. Изходни характеристики на пациентите с хроничен хепатит В на комбинирана терапия Zeffix – Peg-IFN alfa 2.

Пациент	NUC	Пол	Възраст	F	HBsAg IU/ml	HBV DNA IU/ml	ALT U/L
1	Tenofovir	жена	48	0	256	0*	10
2	Telbivudine	жена	40	1	2779	0	23
3	Tenofovir	мъж	51	1	2058	9580	17
4	Tenofovir	мъж	36	1	4160	1300	21
5	Tenofovir	жена	36	1	2400	0	31
6	Telbivudine	мъж	20	2	35744	0	47

*Кратък начин за представяне на неоткриваема HBV DNA

При шестима HBeAg/-/ пациенти -3-ма мъже и 3 жени, лекувани продължително с НУК, в последствие се включи и Peg-IFN alfa – 2a (табл.25).

Четирима от тях – 2-ма мъже и 2 жени – бяха приемали Тенофовир повече от 6 години по клинично проучване. Поради прекратяване на проучването Тенофовир беше спрял. Започна се Зефикс по 1 табл/дн и Peg-IFN alfa – 2a по 180 мкг/седм. При двете жени (Пациент №2 и №5) при започване на

новата схема виремията беше негативна, докато при двама мъже (пациент №3 и 4) имаше известен период между спирането на Тенофовир и започване на схемата и затова имаха невисока виремия.

Изходните характеристики на пациентите, изходните нива на ALT, HBV DNA, HBsAg са показани на табл.25. Двата медикамента – Зефикс и Рег-IFN alfa – 2a се прилагаха заедно 6 месеца, след което пациентите продължиха приема само на Пегасис. Като на 3 и 6-ти месец при всички пациенти виремията беше негативна. Динамиката на HBsAg е показан на таблицата 26.

Таблица 26. Динамика на количествения HBsAg IU/ml, при проследените пациенти.

Пациент	Изходно	3ти месец	6ти месец	9ти месец	12ти месец	15ти Месец	18ти месец	21ви месец
1	256	>130	183,00	130,00	114,00	94	73	83
2	2779	970	227,00	111,00	69,5	49	39	<0,05
3	2058	3540	876,00	576,00	512,00	<u>Спряна терапия</u>		
4	4160	6734	5642,00	3678,00	2574,00	<u>Спряна терапия</u>		
5	2400	1720	915,00	733,00	210,00	<u>Спряна терапия</u>		
6	35744	81499	62612	54351	55000		55194	<u>Спряна терапия</u>

При пациент №1 лечението продължава, като до 18 месец дозата на Рег-IFN- alfa 2a е пълна 180 мкг/седм., а след това по 90 мкг/седм. Виремията е негативна и нивата на HBsAg са трайно под 100 IU/ml, но няма образувани антитела. Отчита се значителен спад на HBsAg (70%) на

изходните стойности, спрямо последния резултат от проследяването. Терапията продължава.

При пациент №2 лечението с Peg-IFN- alfa 2a първите 12 месеца беше основно с по 135 мкг/седм, поради левкопения и тромбоцитопения. След 12-ти месец дозата е по 90 мкг, като на 18-ти месец HBsAg е 39 IU/ml и има поява на вiremия 300 IU/ml, при нормални аминотрасфери. На 21-ви месец, обаче вiremията е негативна и HBsAg <0,05 IU/ml. Лечението продължава.

При пациент №3, динамиката на HBsAg е посочена в таблицата. Дозата на Пегасис е 180 мкг.седм. Терапията е спряна по желание на пациента на между 12 и 15ти месец. Като спада на HBsAg – изходно – 12-ти месец е 75%. Пациентът е с негативна вiremия, вече 6 месеца след спиране на терапията и последен резултат на HBsAg – 29 IU/ml.

При пациент №4 изходните нива на HBsAg бяха 4160, на 3-ти месец се повишава със 62%. На 12-ти месец е налице вирусологичен пробив – вiremията е 470 000 IU/ml и терапията с Пегасис беше спряна. Но нивата на HBsAg на 12-ти месец са с 38 % по-ниски в сравнение с изходните. Започна се отново Тенофовир.

При пациент №5 на 12-ти месец имаше вiremия 250 IU/ml, но със значителен спад на HBsAg с 91% спрямо изходните нива. Лечението с Пегасис беше спряно, по желание на пациентката. При проследяване 6 месеца след спиране на терапия, вiremията продължава да е под 1000 IU/ml, при нормални аминотрасфери.

При последния пациент №6 изходните нива на HBsAg бяха над 35000, като на 6-ти месец те се увеличават със 130%. В следствие имаше лек спад, но нивата не спаднаха под изходните (на 12-ти месец са 54300) и лечението с Пегасис беше спряно.

6. Удължаване на терапията с Peg-interferon-alfa-2a при пациенти с ХХВ.

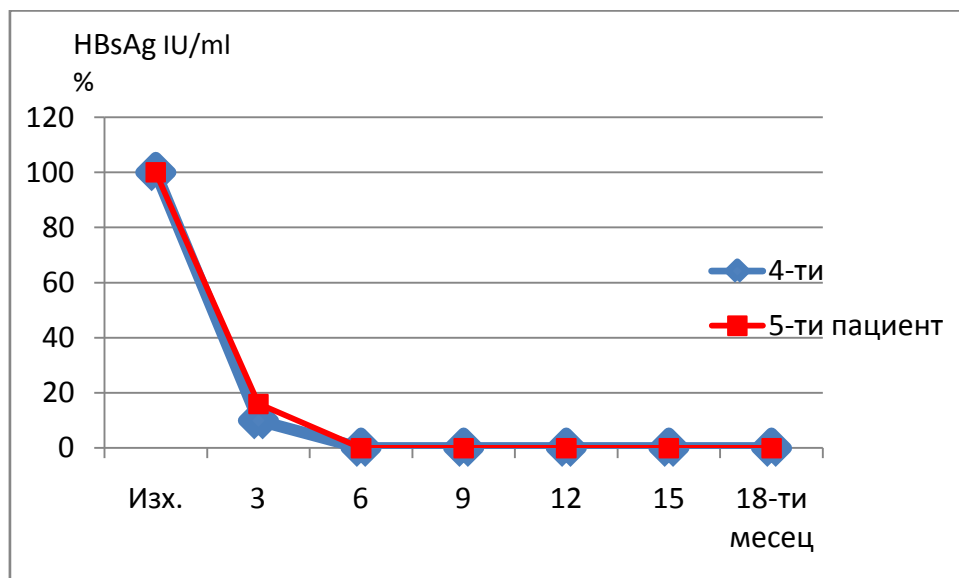
При 7 от проследените пациенти, поради значимия спад на количествения HBsAg по време на лечението (с повече от 90% и ниво на 12-ти месец под 100 IU/ml), решихме терапията да бъде удължена повече от стандартния период (повече от 48 седмици). Това са 2-ма HBeAg (+) (№4 и 5 от табл. 20) и 5-ма HBeAg(-) (№ 6 (табл. 24), 8, 18, 19 и 21 от табл.23). Всички тези пациенти не изпълняват т.нар. „правила за спиране” на терапията (stopping rules) (липса на какъвто и да е спад на HBsAg на трети месец от интерфероновото лечение и липса на спад на HBV DNA с повече от 2 log на трети месец).

HBeAg (+) пациенти, с удължена терапия: пациент № 4 и 5 от табл. 20.

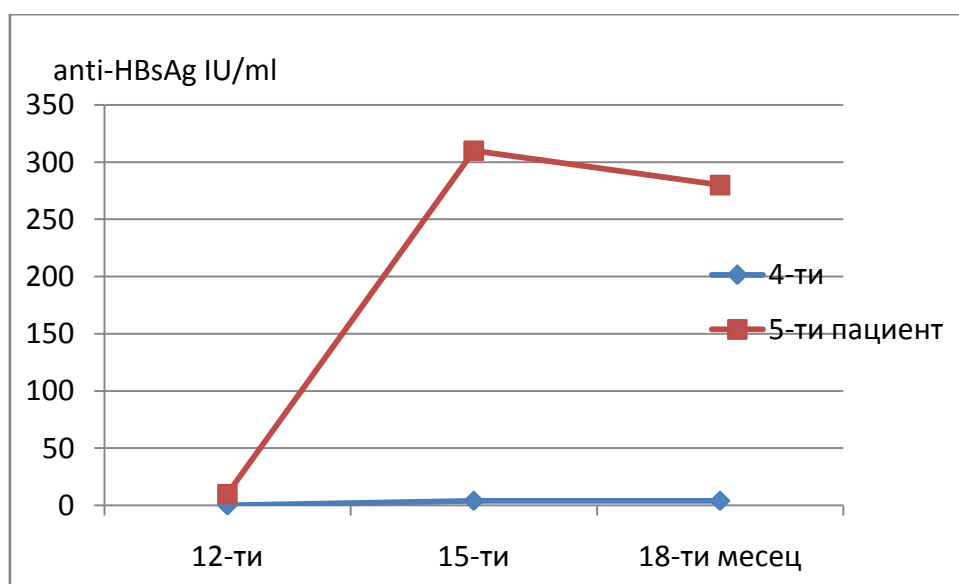
Пациент № 4 е 27г. мъж, с изходна вирусемия 11 850 000 IU/ml, HBsAg 78 452, ALT 240. На 3-ти месец HBsAg е 4000, на 6-ти -51, 9-ти -6 IU/ml, на 12-ти <0,05. Продължихме лечението със 180 мкг/седмично, като на 15-ти месец HBsAg е <0,05 и anti-HBsAg – 4 IU/ml. На 18-ти месец резултатите са без промяна и лечението продължава. Терапията продължава (фиг. 14,15).

Пациент №5 е 30г. мъж, със степен на фиброза – 3, изходна вирусемия 209 000 000 IU/ml, HBsAg – 36 399, ALT 93. На 3 месец – HBsAg-5798, на 6-ти месец 0,16, на 9-ти и на 12-ти месец – <0,05, като на 12-ти месец има anti-HBsAg – 10 IU/ml. Лечението продължава. Като на 15-ти месец anti-HBsAg – 310 IU/ml, а на 18-ти – 280 IU/ml и терапията продължава (фиг 15, 16).

Фигура 15. Спад на HBsAg в процент при 2-мата HBeAg-позитивни пациенти с удължена терапия



Фигура 16. Титър на anti-HBsAg по време на лечение при 2-мата HBeAg-позитивни пациенти с удължена терапия



HBeAg +/- пациенти

Пациент №6 е 40г. мъж, изходна вирусемия 1 390000 IU/ml, HBsAg -4148 IU/ml, ALT – 152 U/L. На 12 месец – HBsAg беше 55 IU/ml, при негативна вирусемия. Продължихме терапията с по 90 мкг/седм. Пегасис. На 15 месец

HBsAg се беше повишил на 115 и терапията беше спряна. 3 месеца по-късно HBsAg е 403, а HBV DNA -1570 IU/ml. Девет месеца след спирането на терапията HBV DNA е 37 000 IU/ml. Две години след спиране на терапията HBV DNA е 600 IU/ml, като няма цитолитична активност (фиг. 17,18).

При пациент №8 - Той е 23 г. мъж с изходна вирусемия 3 090 000 IU/ml, HBsAg – изходно 11057 IU/ml и ALT 268 U/L. Като на 12 месец HBsAg беше 0,18 IU/ml. Продължихме със 180 мг/седм още 6 месеца, като на 18 месец, при пациента имаше anti-HBsAg /118 IU/L/ и терапията беше спряна (фиг. 17,18).

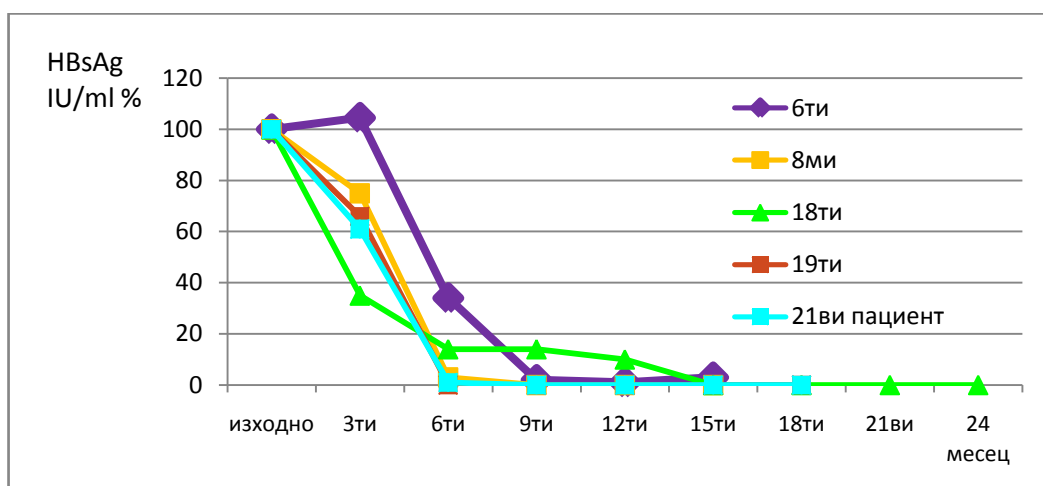
Пациент №18 е жена на 36г.с изходна вирусемия 714 000 IU/ml, HBsAg 535, ALT 55. На 12 месец HBsAg беше 51,6. Продължихме терапията с по 90 мг/седмично до 18 месец и от 18-я месец по 60 мкг/седм. Като на 15 месец HBsAg е 26, а на 18-ти – 1,63. На 21-ви, 24-ти и 27-ми месец HBsAg е < 0.05 IU/ml. При негативна вирусемия. Пациентката продължава терапията. На този етап няма anti-HBsAg (фиг. 17,18).

Пациент №19 е 29 г. мъж с изходна вирусемия 21100 IU/ml, HBsAg – 859, ALT -55, като още от 6 месец HBsAg е 0,10, на 9 и 12 е <0,05 и HBsAg/-/, anti HBsAg -21 (на 12 месец). Между 12 и 15 месец, продължихме със 180 мкг/седм, като на 15-ти месец anti-HBsAg са 63. Между 15-ти и 18-месец – по 60 мг/седмично и на 18-ти месец anti HBsAg са 483 IU/ml. На 18-ти месец терапията беше спряна (фиг. 17,18).

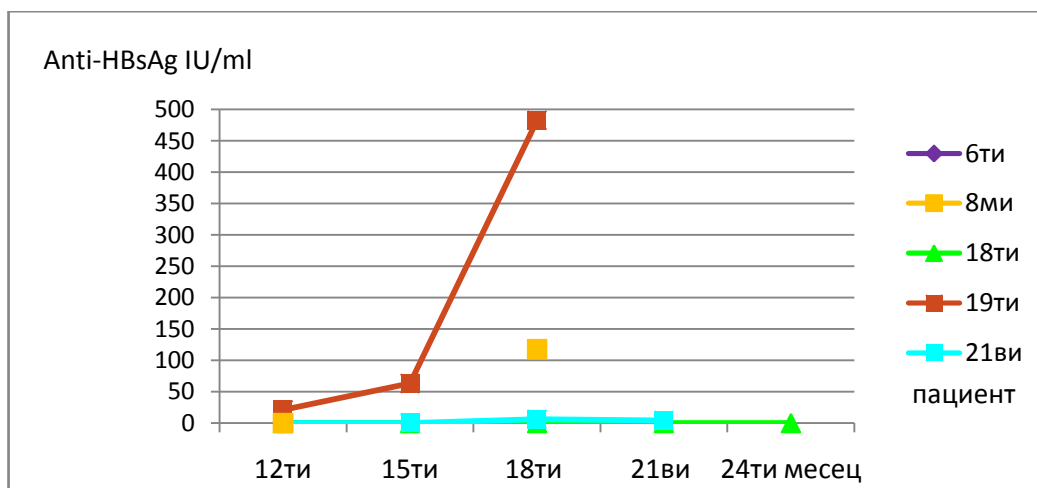
Пациент №21 е 33 г. мъж с изходна вирусемия 674 000 IU/ml, HBsAg 1866, ALT 33. При него още в самото начало лечението е започнато с 90 мкг/седм, поради ниски стойности на тромбоцитите. На 6 месец HBsAg е 14, на 9 месец – 1,33, на 12-ти 0,40, на 15-ти и 18-ти е <0,05. На 18-ти

месец има anti-HBsAg 6 IU/ml. На 21 месец 4 IU/ml – anti-HBsAg. На този етап продължава терапията (фиг. 17,18).

Фигура 17. Спад на HBsAg в процент при 5-мата HBeAg-негативни пациенти с удължена терапия



Фигура 18. Титър на anti-HBsAg по време на лечение при 5-мата HBeAg-негативни пациенти с удължена терапия



При трима от петимата HBeAg +/- пациенти с удължена терапия се установиха anti-HBsAg. Като при двамта от тях терапията е спряна, поради добрия отговор (пациент №8 и 19), а при един продължава, поради ниския титър на антителата (пациент №21). Един от другите двама

пациенти – нямаше отговор на удължената терапия и тя беше спряна (пациент №6). А при втория, терапията още продължава, поради липса на антитела (при HBsAg<0,05 и негативна виремия) (пациент №18).

В последствие при проследяване на пациент № 19, шест месеца след спиране на терапията, антителата бяха спаднали до 4 IU/ml и HBsAg се позитивира. Другият пациент с антитела, е извън България и, поради това не е проследяван след спиране на удължената терапия.

VII. ОБСЪЖДАНЕ

Стандартната двойна терапия, включваща Peg-IFN-alfa 2a и Ribavirin, все още е първи избор за лечение на пациенти с хронична HCV инфекция, нелекувани до този момент и с ненапреднала болест. Като успеваемостта на терапията е повече от 50% за генотип 1 и повече от 80% за генотип 3 (48, 9, 2). Нашите данни показаха сходни резултати. Важна е добрата оценка на изходните характеристики на пациентите, с оглед предсказване на евентуалния отговор и при липса на добра констелация за това, пациентът да бъде насочван към друг по-мощен терапевтичен режим.

Мултиварианти анализи са идентифицирани два основни предиктори на ТВО: вирусния генотип и вирусно натоварване преди лечение (54,67,114).

Нашите резултати, подобно на резултатите на К. Антонов и съавтори, не потвърдиха значението на изходните нива на HCV RNA за постигане на ТВО (16). Като най-силните изходни предсказващи фактори (предиктори) на ТВО са: HCV генотип; генетичния полиморфизъм разположен в хромозома 19 (IL28B) и стадия на чернодробна фиброза (47,48). Нашите данни потвърждават, че наличието на ЧЦ се свързва с по-малък шанс за постигане на ТВО, независимо от генотипа на HCV инфекцията. Малко са данните за българската популация и полиморфизма на IL28B. Нашите данни, за пациентите с генотип 1, подобно на тези на Иванова А (2010) (8), показват преобладаващ процент (>50%) на С/Т генотипа и по-малък % (около 20%) за С/С и Т/Т съответно. Установява се корелация с IL28B полиморфизма при тези пациенти и постигането на RVR и ТВО, като наличието на С/С генотип се свързва с най-голям шанс за постигане на RVR и ТВО. Важна е обаче цялостната оценка на пациента, като изходни

характеристики и отговор в хода на лечение, а не само IL28B полиморфизма, като самостоятелен фактор(3).

При пациентите с HCV генотип 3, се установиха само генотипове C/C (при 5 пациенти) и C/T (9 пациенти). Като при генотип 3, полиморфизмът на IL28B няма връзка с постигането на ТВО. Според Marabita F и съавтори, IL28B полиморфизма определя HCV РНК кинетика по време на лечението. Като CC генотипа се свързва с ранния спад на вируса по време на терапията с Peg-IFN α / RBV, независимо от HCV генотипа (115).

Поради това IL28B алелните варианти не оказват влияние върху вероятността от рецидив при прекратяване на лечението, което най-вероятно е резултат от липсата на влияние на IL28B генотипа относно втората фаза на вирусна кинетика в хода на терапията (111).

При пациентите с генотип 3 се установи корелация между изходната вирусна концентрация и IL28B полиморфизма, както и между последния и изходните стойности на АЛАТ. Като при C/C генотип вирусната концентрация и АЛАТ са значително по-високи, в сравнение с тези при C/T генотип. При генотип 1 пациентите се установи корелация между IL28B генотипа и АЛАТ, като при пациентите с алел C, изходните нива на АЛАТ са по-високи. Относно вирусната концентрация не се установява статистическа разлика. Хипотетично ниската изходна вирусна концентрация на ISGs (интерферон стимулираните гени) свързана с благоприятния IL28B генотип може да се свърже с по-ниска спонтанна антивирусна активност в гостоприемника, което на свой ред позволява засилена HCV репликация (173, 20). Резултатите обаче са противоречиви, тъй като други изследвания не потвърждават подобна връзка между IL28B генотипа и HCV RNA нивата (152).

Нашите резултати не показаха връзка със степента на стеатозата и постигането на ТВО (за разлика от резултатите на Antonov K, и съавтори) (17).

* * * * *

Не се установи връзка на ТВО с изходните серумни нива на витамин Д, най-вероятно, поради малкия брой пациенти. Липсва връзка и с нивата на В12, фолиева киселина, липиди.

Установи се, обаче силна връзка между нивата на IP-10 и постигането на бърз вирусологичен и респективно ТВО. Като ниските нива <150 pg/ml, се свързват с по-голям процент на постигане на бърз вирусологичен и ТВО.

Концентрацията на IP-10 отразява възможността на локалната хемокинова сигнализация в хепатоцитите, инфектирани с HCV, която води до привличане на мононуклеарни клетки в черния дроб за справяне с инфекцията. Съществува хипотеза, че с намаляване на интрахепаталната вирусната репликация по време на лечението, намалява и хемокиновата сигнализация от инфектирани хепатоцити. Ако вирусът не е ликвидиран след приключване на терапията, интрахепатална вирусната репликация, и по този начин хемокиновата сигнализация, подновява след спирането на антивирусната терапия (96). Изходните нива на IP-10 бяха значително по-ниски при пациенти с HBV инфекция, отколкото при HCV пациентите, генотип 1. Според нашите резултати IP-10 нивата не корелират с вирусен товар и при HBV и HCV пациенти. IP-10 изходни серумни нива не могат да прогнозира вирусологичен отговор при пациенти, инфектирани с HBV на лечение с нуклеотидни аналози или IFN. Лечението с IFN или NUC при хронична HBV инфекция не променя нивата на IP-10, за разлика при пациенти с хронична HCV с отговор на терапия с Peg-IFN и Ribavirin. Тъй като IFN-а и ISGs са важни в имунния отговор срещу HBV, и Peg-IFN-alfa

се използва за лечение на хронична HBV инфекция, подобно на HCV инфекция, може да се предположи, че IL28B също може да бъде от значение за лечението и изхода от HBV инфекция. Наличните проучвания, обаче не потвърждават връзка на IL28B полиморфизма с отговора на терапия с ИФН при пациенти с хроничен хепатит В (121).

Най-вероятно за разлика от HCV инфекция, IL28B полиморфизма изглежда действа чрез различен механизъм по отношение на отговора на лечение с ИФН при хроничен хепатит В, както и на спонтанно изчистване на HBV инфекция (83). Това може да обясни липсата на връзка на нивата на IP-10 с отговора на лечение с ИФН при хроничния хепатит В, както и липса на промяна в хода на лечението.

Най-силен предиктивен фактор за постигане на ТВО при пациенти с генотип 1 е постигането на бърз вирусологичен отговор. Нашите резултати потвърждават тези данни. При генотип 3, постигането на RVR не е свързано с постигането на ТВО в последствие. Всички проследени пациенти с генотип 3 имаха постигнат RVR, а ТВО беше постигнат от 88%. Установи се силна корелация между наличието на анемия (като странична реакция на терапията) на 4-та седмица от лечението и постигането на бърз, ранен и траен вирусологичен отговор.

* * * * *

Проследихме малка група пациенти с напреднала чернодробна болест HCV и без налична терапия за настоящия момент. Нашата цел беше да намалим чернодробното възпаление и да стабилизиране чернодробната болест чрез модулиране на имунната система.

Ние решихме да комбинираме тези два медикамента, поради техните имуномодулиращи ефекти. През последните години, заедно с директните

му антивирусни ефекти, беше съобщено за имуномодулиращите ефекти на Рибавирин. Ribavirin индуцира превключване на Т-хелперните клетки (Th) от тип 2 фенотип към тип 1 (т.е. към от хуморален към клетъчен имунитет) (75,81,136). Според резултати на Petrova и съавт. Isoprinosine има способността да активира цитокиновата каскада от първия ден на приема му (144) и по този начин наподобява ефектите на IFN в стандартната двойна терапия.

Избрахме да проследим IP-10, като сурогатен маркер на IFN- γ системата и като предиктор за отговор към IFN-базираната апия. Ribavirin може да провокира лимфопения (3%) (Кратка характеристика на продукта), но в същото време Изопринозина повишава левкоцититния и понижава нивата на IP-10 (87).

Ние наблюдавахме стабилна редукция на аминотрансферазите и липса на тежки странични реакции при тази комбинирана терапия. Затова ние решихме да продължим този терапевтичен режим и да проследим пациентите за повече от година. Тази комбинация от Isoprinosine и Ribavirin възстановява имунната компетентност и значително понижава нивата на IP-10 до такива стойности, при които последваща ИФН терапия би била успешна. Но не се наблюдава ефект върху вирусния товар. Това е най-вероятно белег на индиректния имуномодулиращ ефект на двата медикамента. Понижението на аминотрасферазите се свързва с подобряващия ефект върху болестта. Промените на вiremията $\pm 0.5 \log$ не са значими и се дължат на естествената флукуация на HCV RNA без терапия (134).

Подобно на ИФН, скоро след началото на терапията, се наблюдава едно повишаване на IP-10 серумните нива (153,176) и тук ние установихме

първоначално повишаване /10-20 ден/ на IP-10 и последваща тенденция към намаляване.

Продължителния продължителен прием на Isoprinosine и Ribavirin се понася добре, без тежки странични реакции. Тази комбинирана терапия води до

- Намаряване на тежестта на болестта и чернодробното възпаление (оценени чрез постигане на биохимичен отговор, повишаване на тромбоцитите)

- Значително понижаване (>50% от изходните стойности) на IP-10 за 12 – месечен период на лечение, което е белег за възстановяване на имунната компетентност на организма.

- Липса на отговор върху вирусния товар.

* * * * *

Нуклеоз(т)идните аналози потискат силно вирусната репликация при ХХВ. Въпреки натрупаните знания, информацията за техния ефект върху кинетиката на HBsAg нивата е ограничена, особено при пациенти с HBV инфекция, генотип D. Това е първото проследяване на количествения HBsAg при български пациенти по време на терапия с NUC. От тази гледна точка получените резултати са важни за българските пациенти, инфектирани с HBV, тъй като при почти 100% генотип D (6,93).

Нашите резултати показваха, че изходните нива на HBsAg са 3 пъти по-високи при HBeAg-позитивните пациенти, в сравнение с тези при HBeAg-

негативните. Скорошно проучване съобщи подобни резултати, но повечето от изследваните пациенти са HBV генотип различен от D (186). При 2/9 от HBeAg-позитивните и 3/11 от HBeAg-негативните пациенти установихме първоначално увеличаване на нивата на HBsAg по време на лечението. Причината остава неясна. Една от възможните причини, които биха могли да се обсъждат е, че това увеличаване на нивата на HBsAg се дължи на освобождаването му след усилено изчистване на инфектираните хепатоцити, като резултат от възстановяване на имунния отговор на гостоприемника след бързия спад на вирусния товар от действието на NUC. Все пак ние не наблюдавахме паралелно увеличаване на ALT, затова са необходими допълнителни изследвания за изясняване на наблюдавания феномен.

Нашите резултати са в съответствие с няколко предишни проучвания, които показват по-изразено намаление на количествения HBsAg по време на терапията с NUC при HBeAg-позитивни, отколкото при HBeAg-негативни пациенти (70, 186, 154). Дори в относително малката група от HBeAg-положителни пациенти, ние наблюдавахме подобни модели на HBsAg кинетика, описани в проучвания, състоящи се от по-големи групи пациенти (177,186). В нашата група 1/3 от HBeAg-позитивни пациенти бяха с бърз спад на HBsAg при лечението на месец-12. Изходните характеристики на тези пациенти са сходни с идентифицираните предиктори на бърз HBsAg спад в повечето проучвания: бялата раса; високо изходно ниво на HBV DNA, по-високи нива на HBsAg, и високо изходно ниво на ALT (70, 177,186,116).

Ограниченията на нашето изследване са малкия брой пациенти и относително краткия период на проследяване по време на оценка по време на NUC лечението. За разлика от другите изследвания, ние не наблюдавахме загуба на HBsAg. Това може да се дължи на малкия брой

пациенти, както и на липсата на спад на количествения HBsAg с $> 1 \log 10$ IU/ml на трети месец от лечението. Нито един от нашите пациенти не беше с изходни стойности на ALT, повишени 5 пъти над горна граница. Намаляване на HBsAg нивата с $> 1\text{-log}10$ на 12-та или 24-та седмица, както и повишени изходни нива на ALT > 5 пъти над горната граница на нормата, са посочени като най-важните силни предиктори на HBsAg клирънс (35,116,177). HBsAg загуба може да бъде повлияно от HBV генотипа. Има съобщения, че процента на изчистване на HBsAg при лечение с NUC е по-висок при пациенти инфектирани с генотип А, в сравнение с не- А генотип (177) и че HBsAg загубата е много рядко при азиатски пациенти с генотип В или С (70, 60). Само един от нашите HBeAg-позитивни пациенти постигна значим спад на HBsAg до 100 IU/ml. При този конкретен пациент загуба на HBsAg вероятно би могла да настъпи по време на следващите години от NUC терапия, като темповете на HBsAg изчистване при HBeAg-позитивни пациенти, може постепенно да се увеличи от 3% до 8% след удължаване на терапията с Тенофовир от 1-3 години, съответно (70).

От друга страна нивата на HBsAg при по-голяма част от HBeAg-позитивните пациенти в настоящото проучване остават > 1000 IU/ml при 12 – месечно лечението. Предишни изследвания на HBeAg-позитивен пациенти показват, че намаляването на HBsAg е основно в рамките на първата година от лечението NUC, и нивата на HBsAg остават относително стабилни след това (70, 177).

Ние не наблюдавахме бърз спад на нивата на HBsAg сред нито един от HBeAg-негативните пациенти. Това е в съответствие с констатациите в повечето проучвания при HBeAg-негативни пациенти (56,70,186). Заедно всички тези данни ясно показват, че нивата на HBsAg, дори и след продължително лечение с NUC, остават стабилни или намалява много

бавно, така че загуба на HBsAg рядко се постига. Математически модели показват, че по-голямата част от пациентите ще се нуждаят от повече от 3 десетилетия терапия с NUC за постигане на HBsAg изчистване (186). От концептуална гледна точка, е известно, че NUC само блокират обратната транскриптаза, което намалява HBV DNA синтеза, но имат слаб ефект върху cccDNA, което е ограничаващ фактор за пълно изчистване на хроничната HBV инфекция (171). Въпреки че механизма на понижаване на HBsAg по време на лечението с NUC е неясен, може да се предполага, че намаляването на нивотата на HBsAg отразява по-добра степен на имуноен контрол на гостоприемника срещу вируса на хепатит В (171). Понижаването на HBsAg спад може да се наблюдава само при пациенти, които имат някакво ниво на имуноен отговор, който обикновено се свързва с по-високи нива на ALT. Ролята на имунония отговор при изчистването на HBsAg наскоро бе съобщено от J. Jaroszewicz и съавтори (76), които показваха, че високи изходни нива на IP-10 прогнозира HBsAg-загуба по време на терапията с NUC.

Тъй като изчистването на HBsAg от серума по време на лечение с NUC е рядко явление, добавянето на имуномодулатор е ключова терапевтична стратегия за увеличаване честотата на това важно събитие. Наскоро съобщихме, че добавянето на inosine pranobex към NUC, след постигане на стабилен вирусологичен отговор в хода на NUC терапия, води до допълнително понижаване на нивата на HBsAg (133,92). Добавянето на IFN към NUC все още не е утвърдено и подлежи на допълнителни изследвания. Първите съобщения са при малки групи пациенти и показват обещаващи резултати (118,160). Междинните данни на обширно изследване със сходен дизайн също са обещаващи, но това проследяване е все още в ход (97). В момента няколко нови имуномодулиращи агенти,

като терапевтични ваксини или toll-like рецепторни агонисти, са в клинично развитие (33,59,64).

Измерването на HBsAg по време на терапията с NUC не се използва рутинно в ежедневната клинична практика. Въпреки това, след постигане на трайно: неоткриваеми нива на HBV DNA и нормални стойности на ALT, количествения HBsAg остава важен сурогатен маркер за хода на чернодробното заболяване. Мониторирането на HBsAg нивата заедно с HBV DNA може да осигури съществена допълнителна информация. Това може да помогне за дефиниране и оценяване на предстоящите нови терапевтични стратегии.

* * * * *

Изчистването на HBsAg и образуването на anti-HBs се постига в малък процент случаи – не повече от 8 % след Peg-IFN (ограничен във времето курс на лечение - 48 седмици) и при продължителен вирусен контрол чрез потискането на HBV репликация с нуклеозидни / нуклеотидни аналози (дългосрочно) (46,21). И постигане на HBsAg-загуба е добра крайна цел на лечението (46). Обсъжда се дали постигането на анти-HBsAg антитела е необходимо.

Наши резултати показаха значително понижаване на HBsAg при пациенти лекувани с NUC, чрез добавяне на имуномодулатор – Изопринозин (92). Понижаването на HBsAg беше по-значимо при HBeAg +/- пациенти, което не се наблюдава при монотерапия с NUC. Установихме, също така загуба на HBeAg при 3 от 4ма HBeAg +/- пациенти. Така решихме да комбинираме NUC и IFN (като имуномодулатор). Като при 4/6 пациенти се постигна значителна редукция на HBsAg по време на проследявания период и при 2/6 добър отговор след спиране на терапията

(при 2-ма пациенти терапията продължава, при 1 пациент се започна лечение с Тенофовир, поради обостряне на болестта (flare).

Остава въпроса – дали от самото начало да е комбинирана терапията или ИФН да се добави към вече постигнат терапевтичен отговор с трайно потисната вирусемия на фона на NUC (118, 97)

* * * * *

Кратката Peg-IFN alfa-2a терапия (48 седмици) при пациентите с хроничен хепатит В води до HBsAg изчистване на 48 седмица и 6 и 12 месеца след края на терапията в 4%, 5% и 9 % съответно при HBeAg – позитивни пациенти и в 6, 7 и 8% при HBeAg-негативните пациенти (117). Изходните фактори, свързани с добър отговор при HBeAg – позитивни пациенти на терапия с Peg-IFN alfa 2a са ниски нива на HBsAg, повишена ALT (≥ 2 горна референтна граница), нисък вирусен товар ($< 2 \times 10^8$ IU/ml), HBV генотип A>B>C>D, женски пол, див тип на вируса. При HBeAg –негативните пациенти изходните предиктивни фактори са подобни, но не така добре дефинирани (46). Резултатите от нашето проследяване показва, че по-важна предиктивна стойност има спада на HBsAg на третия месец и в последствие на 12^{ти} месец, отколкото изходните му нива.

Наскоро се въведе т.нар. спиращо терапията правило – при липса на спад на количествения HBsAg на седмица 12 по време на Peg-IFN alfa 2a лечението, с негативна предиктивна стойност NPV 97-100% (165).

Скорошни изследвания показаха, че удължаването на терапията при HBeAg-негативните пациенти, генотип D, се асоциира с продължаващо понижаване на HBsAg и увеличаване на процента на HBsAg загуба (89,98,99). Chan и съавт. показаха, че понижението на HBsAg нивата под 1500 IU/ml на седмица 12 и до 300 IU/ml на седмица 24 при малка група

от HBeAg-позитивни пациенти се свързва със 70% позитивна предсказваща стойност за отговор на Peg-IFN терапия (35). Като имуномодулятор IFN държи HBV вируса под имунен контрол при отговарящи на терапията пациенти. Също така Brunetto и съавтори показаха, че HBsAg < 10 IU/L на 48 седмица и след с > 1 log₁₀ IU/mL по време на лечение се свързва с HBsAg изчистване 3 години след лечението (при наличие на двете P < 0.0001) (31).

При част от проследените пациенти, водени от тяхното желание, ние решихме да удължим IFN терапия повече от 48 седмици. Това бяха 5 HBeAg/-/ и 2 HBeAg/+/- с количество на HBsAg <100 IU/ml на 12ти месец и редукция спрямо изходните нива с >90%. Ние предлагаме „правило за удължаване” на терапията.

Удължаването на терапията при пациенти с хронична HBV инфекция, с неоткриваема HBV DNA и HBsAg <100 IU на 48 седмица и понижаване на HBsAg с >90% от изходните нива (правила за удължаване) доведе до засилване на HBsAg загубата и по-ранна поява на антитела, в сравнение с ограничена 48-седмична терапия (за сравнение при пациент №3 от HBeAg –негативните, anti-HBsAg в нисък титър се появиха 3 години след спиране на стандартната терапия).

При 5/7 пациенти бяха регистрирани анти-HBsAg по време на периода на удължена терапия – 3/5 HBeAg – негативни пациенти и 2/2 HBeAg – позитивни пациенти. При 2-ма (HBeAg /-/- пациенти) от тях терапията беше спряна, поради титър на антителата >100 IU/L. При един от тези пациенти с титър антитела >100, 6 месеца след спиране на ИФН, същите бяха спаднали до 4 IU/L и HBsAg се позитивира. При 2-та HBeAg – позитивни пациенти терапията продължава. При единия – титъра на антителата е > 100, а при другия е все още нисък (4 IU/ml).

Може би оптимизиране на проследяването и поведението с наличните на този етап терапевтични средства, е реалната възможност за подобрене на резултатите. Това се състои в добра селекция на подходящите за интерфероново лечение пациенти, преди започването му, съобразно предиктивни фактори (77). В хода на интерфероновото лечение е важно определянето на пациентите без добър шанс за отговор при по-нататъшно продължаване на терапията („правила за спиране”) (165) и такива с възможност за негативиране на HBsAg и образуване на anti-HBsAg при удължаване на терапията повече от стандартните 48 седмици (98,99) (правила за удължаване). Стои въпроса кога да бъде спряна удължената терапия и при какъв титър на anti- HBsAg.

VIII. ИЗВОДИ

1. Ненапредналата фиброза, C/C IL28 B, IP-10 под 150 pg/ml и генотип 3 и бързият вирусологичен отговор се свързват с по-добър ефект от стандартното лечение при хронична HCV инфекция (интерферон и рибавирин).
2. Изходните серумни нива на IP-10 са по-ниски при пациенти с хронична HBV инфекция, в сравнение с пациенти с хронична HCV. Нивата му нямат връзка с отговора при хронична HBV инфекция (и при NUC и IFN), за разлика при хронична HCV инфекция, където намаляват по време при терапевтичен успех.
3. Не се установи връзка на вирусологичния отговор с изходните нива на фолати, витамин B12, витамин Д и липиди при ненапреднало чернодробно увреждане на хроничен хепатит С.
4. При пациенти с напреднала чернодробна HCV свързана болест и високи серумните нива на IP-10 (>300 pg/ml), комбинираното приложение на Изопринозин и Рибавирин доведе до контрол на болестта (аминотрансфери) и до понижаване нивата на IP-10 до стойности <150 pg/ml, но не и до промяна на виремията.
5. HBeAg/+/ пациенти се характеризират с по-високи изходни нива на HBsAg и HBVDNA, в сравнение с HBeAg/-/ пациенти. Спадането на HBsAg за една година при лечение с NUC е по-слабо изразнено, в сравнение с лечение с IFN, като и при двата вида лечение се наблюдава по-значима редукция на HBsAg при HBeAg/+/ пациенти.

6. При пациенти с добър отговор на терапия с IFN (спад на HBsAg на 12ти месец с >90%, спрямо изходните нива, и при стойности на HBsAg <100 IU/ml на 12тия месец, при негативна виремия – ние предлагаме т.нар. „правило за удължаване” на терапията, като доказахме усилване появата на анти-HBsAg при удължаване на терапията, повече от 48 седмици.

IX. ПРИНОСИ

1. Предложихме въвеждане на т.нар. „правило за удължаване” на стандартната терапия с Peg-IFN при пациенти с хроничен вирусен хепатит В.
2. Продължителното прилагане на имуномодулиращите медикаменти Изопринозин и Рибавирин при пациенти с напреднала HCV свързана чернодробна болест, води до редуциране серумните нива на IP-10 с повече от 50%.
3. Потвърдихме предиктивната роля на IL28B генотипния статус на български пациенти с хронична HCV инфекция, генотип 1, за отговора на стандартна двойна терапия.
4. Проследихме количествения HBsAg при български пациенти с хронична HBV инфекция, на лечение с NUC или Peg-IFN, като предложихме модели на динамика с практическо клинично приложение.

Х. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Антонов К, Василев М, Желев Д, Кръстев З Лечение с лимфобластоиден интерферон-алфа (Wellferon) на болни с хронична HCV инфекция. Съв. медицина 1997; 1:49-51.
2. Антонов К, Желев Д, Колчаков, Попов Д, Димитрова, Иванова И, Кръстев З, Пегилиран интерферон алфа-2а и рибавирин срещу интерферон-алфа 2а и рибавирин при пациенти с хроничен хепатит С. Българска хепатогастроентерология 2005; 2: 15-18.
3. Антонов К, Иванова А, Желев Д, Матева Л, Кръстев З. Полиморфизъм на IL-28В при български пациенти с хронична HCV генотип 1 инфекция – връзка с вирусологичния отговор на лечението с Peg-IFN а и Ribavirin, Българска хепатогастроентерология, 1, 2012, 41-44.
4. Антонов К, Кръстев З HBeAg – негативен хроничен хепатит В. Съвр. Мед. 1998; 2: 42-43.
5. Диагностичен и терапевтичен алгоритъм (консенсус), Българско научно дружество по гастроентерология, Диагноза, лечение и проследяване на болни с хронични вирусни хепатити, 2010г.
6. Желев Д Хепатит В вирусна инфекция. Характеристика, протичане и възможности за лечение. 2010г. Автореферат на дисертация за присъждане на степен д.м.н
7. Желев Д, Антонов К Различия между HBeAg-положителния и анти-HBe-положителния хроничен хепатит В, Българска хепатогастроентерология, бр.3/2002.
8. Иванова А., Антонов Кр., Желев Д., Матева Л., Кръстев З. Хронична HCV-1 инфекция и полиморфизъм в региона на IL-28В при

български болни. Постер. Национален конгрес по гастроентерология, 11-13 ноември 2010, София.

9. Мендизова А., Г. Мечков, ДВ Димитраков, З. Кръстев и съавтори Ефективност на лечението с пегилиран интерферон алфа-2а (40kD) (Pegasys) в комбинация с ribavirine при болни с хроничен С хепатит – (предварителни резултати от българския опит). Българска хепатогastroентерология 2003; 3: 10 – 14.

10. Aberle JH, Perstinger G, Weseslindtner L et al. CD4_ T cell responses in patients with chronic hepatitis C undergoing peginterferon/ribavirin therapy correlate with faster, but not sustained, viral clearance. J Infect Dis 2007; 195:1315–9.

11. Abu Mouch S, Firemen Z, Jarchofsky J. et al. Vitamin D supplement improves SVR in chronic hepatitis C (genotype 1) naïve patients treated with peg interferon and ribavirin. J Hepatol 2010; 52 (Suppl. 1): S26.

12. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A. et al. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. Hepatology 2001; 33: 1358-1364

13. Ahn SH et al., Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. Hepatology. 2000;31:1371–1373

14. Albert M, Ph.D. Dr. Albert's, IP-10 Protein Levels Predict Hepatitis C Treatment Outcome, January 11, 2011.

15. Alter MJ. Global burden of disease for hepatitis C. J Clin Pharmacol 2004; 44:20–9.

16. Antonov K, Jeleв D, Ivanova A, Krastev Z Predictors of sustained virological response (SVR) to pegylated interferon alpha (peg-ifn alfa) and ribavirin (RBV) in patients with chronic hepatitis c infected with genotype 1, journal of imab - annual proceeding (scientific papers) 2011, vol. 17, book 1

17. Antonov K, Jelev D, Ivanova A et al. The impact of liver steatosis on the efficiency of treatment with PEG-interferon alfa-2a and ribavirin combination therapy in patients with chronic C infection. *JCM* 2009; 1: 21-25
18. Antonov K, Jelev D, Kolchakov V, Krastev Z, Peg-IFN alfa 2a induced immediate cytokine release in patients with chronic HCV infection. *Journal of Hepatology* 2008, vol. 48, Supplement 2: 05C 599; S 223.
19. Askarieh G, Alsi E, Pugnale P et al. Systemic and Intrahepatic Interferon-Gamma-Inducible Protein 10 kDa Predicts the First-Phase Decline in Hepatitis C Virus RNA and Overall Viral Response to Therapy in Chronic Hepatitis C, *Hepatology*, May 2010
20. Asselah T, Bieche I, Narguet S, et al. Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2008;57:516-24. doi:10.1136/gut.2007.128611.
21. Baltayiannis G, Karayiannis P, Treatment Options beyond IFN α and NUCs for Chronic HBV Infection. *J Viral Hepat.* 2014;21:753-761.
22. Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M et al. Hepatitis C Virus Core Protein Upregulates Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Impairs the Downstream Akt/Protein Kinase B Signaling Pathway for Insulin Resistance. *J Virol* 2008, 82(6):2606-2612.
23. Bertoletti et al. HBV-Specific Adaptive Immunity, *Viruses* 2009, 1, 91-103; doi:10.3390/v1020091
24. Boesecke C, Wasmuth J, Hepatitis C, *Hepatology* 2014 (p 48-71)
25. Bömmel F, Wiegand J, Berg T, Hepatitis B Treatment, *Hepatology* 2014
26. Boni C. et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J. Virol.* 2007, 81, 4215-4225.

27. Bonilla GR, Roberts LR The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005;42: 760–777
28. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”? *Hepatology* 2001;34:194–203.
29. Brok J, Gluud L, Gluud C, Ribavirin monotherapy for chronic hepatitis C, Published Online: 19 OCT 2005, Editorial Group: Cochrane Hepato-Biliary Group
30. Brunetto MR, Giarin M, Oliveri F et al. ‘e’Antigen defective hepatitis B virus and course of chronic infection. *J Hepatol* 1991;13:S82–S86.
31. Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F et al. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:1141-1145
32. Brunetto MR, Oliveri F, Coco B et al. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long-term cohort study. *J Hepatol*,2002;36:263–270.
33. Buchmann P, Dembek C, Kuklick L et al. A novel therapeutic hepatitis B vaccine induces cellular and humoral immune responses and breaks tolerance in hepatitis B virus (HBV) transgenic mice. *Vaccine*. 2013 Feb 6;31(8):1197-203. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.074. Epub 2013 Jan 7.
34. Camma C, Bruno S, DiMarco V, et al. Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43: 64-71.
35. Chan HL et al., Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response., *Clinical Gastroenterology and Hepatology : the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* [2007, 5(12):1462-1468]

36. Choi J, James JH, Mechanisms of liver injury.III: Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290:G847-G851.
37. Cornberg M, Siederdisen C. HBsAg seroclearance with NUCs: rare but important. *Gut*. 2014; 63(8):1208-9
38. Cornberg M., Siederdisen C., Maasoumy B. et. al. Standard Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection, *Hepatology* 2014
39. Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, et al. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 45: 80-87.
40. Cox AL, Mosbrugger T, Mao Q, et al. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 2005; 201:1741–52
41. Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000; 118:346–55
42. Crotty Sh., Cameron C., Andino R., Ribavirin’s antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J Mol Med* (2002) 80:86–95 DOI 10.1007/s00109-001-0308-0
43. Davis G.,Dempster J. et al. Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem, *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2008;21(3):266–280
44. Derbala M, Rizk NM, Al-Kaabi S, The predictive value of IL28B rs12979860, rs11881222 and rs8099917 polymorphisms and IP-10 in the therapeutic response of Egyptian genotype 4 patients, *Virology*. 2013 Sep;444(1-2):292-300. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.025. Epub 2013 Jul 16.
45. Di Bisceglie A, Hepatitis B And Hepatocellular Carcinoma, *Hepatology*. 2009 May ; 49(5 Suppl): S56–S60. doi:10.1002/hep.22962.

46. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines (EASL): Management of chronic hepatitis B virus infection *Journal of Hepatology* 2012 vol. 57 j 167–1858.
47. Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Hepatology*. 2011 Aug;55(2):245-64. Epub 2011 Mar 1.).
48. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection, *Journal of Hepatology* 2014 vol. 60 j 392–420
49. Eleanor B. et al. Cellular Immune Responses during High-Dose Interferon- α Induction Therapy for Hepatitis C Virus Infection *The Journal of Infectious Diseases* 2009; 199:819 –28
50. Fartoux L, Poujol-Robert A, Guéchet J. et al. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2005; 54: 1003-1008.
51. Fattovich G, Covolo L, Bibert S, et al. IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C, *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 May;33(10):1162-72. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04635.x. Epub 2011 Mar 28
52. Fauci AS, Rosenberg SA, Sherwin SA, et al. NIH conference. Immunomodulators in clinical medicine. *Ann Intern Med* 1997; 106(2):421-33.
53. Freedman N., Curto T., Lindsay L., Elizabeth C. Coffee Consumption Is Associated With Response to Peginterferon and Ribavirin Therapy in Patients With Chronic Hepatitis C, June 2011- *Gastroenterology* Vol. 140, Issue 7, Pages 1961-1969
54. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975–82.

55. Fulop B, Mihm U, Schlosser B et al., Antiviral efficacy of ribavirin monotherapy followed by standard combination treatment in chronic hepatitis c, *Journal of Hepatology* 2010 vol. 52 | S59–S182
56. Fung J, Lai CL, Young J et al. Quantitative hepatitis B surface antigen levels in patients with chronic hepatitis B after 2 years of entecavir treatment. *Am J Gastroenterol.* 2011;106:1766–73
57. Gane EJ, Heathcoate EJ, Marcellin P, Dusheiko G, Jacobson I, de Man R, et al. HBsAg kinetics of decay and baseline characteristics of HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B following 3 years of tenofovir disoproxil fumarate (TDF) treatment [Abstract]. *J Hepatol* 2010;52(Suppl 1.):S388.
58. Ge D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature advance online publication* doi:10.1038/nature08309 (16 August 2009).
59. Gerlich W., *Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now* *Virology Journal* 2013, 10:239
60. Gish RG, Chang TT, Lai CL, et al. Loss of HBsAg antigen during treatment with entecavir or lamivudine in nucleoside-naive HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2010;17:16–22.
61. Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev, Med Virol* 2006; 16:37-48.
62. Grigorescu I M., Radu I C., Crişan I D., et al. Metabolic Syndrome, Insulin Resistance and Adiponectin Level in Patients with Chronic Hepatitis C *J Gastrointestin Liver Dis* June 2008 Vol.17 No 2, 147-154
63. Gripon P, Canine I, Urban S, Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus from the Large Viral Surface Protein Infection by Acylated Peptides Derived , 10.1128/JVI.79.3.1613-1622.2005. *J. Virol.* 2005, 79(3):1613. DOI:

64. Godon O, Fontaine H, Kahi S Immunological and Antiviral Responses After Therapeutic DNA Immunization in Chronic Hepatitis B Patients Efficiently Treated by Analogues, *Molecular Therapy* (2014); 22 3, 675–684. doi:10.1038/mt.2013.274
65. Hadziyannis E. Quantification of HBsAg in serum: characteristics of the assays. *OA Hepatology* 2013 Apr 01;1(1):1.
66. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B – natural history and treatment. *Semin Liver Dis* 2006;26:130–141.
67. 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;140:346–55.
68. Hadziyannis SJ., Sevastianos V., Treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B
69. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:617–624.
70. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M et al. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology*.2011;140:132–43.
71. Highleyman L, Vitamin D Increases Sustained Response to Interferon-based Therapy for Hepatitis C, May Improve Liver Fibrosis, 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2010), April 14-18, 2010, Vienna, Austria
72. Highleyman L, Vitamin B12 Levels May Help Predict Response to Interferon-based Therapy for Chronic Hepatitis C, may 2009, Chicago
73. Hotamisligil GS: The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 1999, 245(6):621-5.

74. Huang H, Sun F, Owen DM, et al. (2007) Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5848–5853
75. Hultgren C, Milich DR, Weiland O et al. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998;79:2381-91
76. Jaroszewicz J, Ho H, Markova A, et al. Hepatitis surface antigen (HBsAg) decrease and serum interferon-inducible protein-10 levels as predictive markers for HBsAg loss during treatment with nucleoside/nucleotide analogues. *Antivir Ther* 2011;16:915–24.
77. Jelev D., Antonov K., Ivanova A., Krastev Z., Predictors of sustained response to interferon based therapy in chronic hepatitis B, *Journal of IMAB - annual proceeding (scientific papers) 2011, vol. 17, book*
78. Kamal SM, Fehr J, Roesler B, Peters T, Rasenack JW. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 123:1070–83
79. Kaplowitz, N. Mechanism of liver injury. *J.Hepatol.*, 32, 2000, suppl.1, 39-47.
80. Kasimov IZ. Efficiency of isoprinosine in the complex treatment of acute virus hepatitis B (Russian). *Lik Sprava* 2004;7:74-77;
81. Kast R. Ribavirin in Cancer Immunotherapies: Controlling Nitric Oxide Augments Cytotoxic Lymphocyte Function, *Neoplasia* 2003; 5:1: 3–8.
82. Kim GA, Lim YS, An J et al. HBsAg seroclearance after nucleoside analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: clinical outcomes and durability. *Gut.* 2014; 63(8):1325-32.
83. 83 /HOB/ Kim S, Song K., Hye Young Chang H et al. Association between IL28B Polymorphisms and

Spontaneous Clearance of Hepatitis B Virus Infection, PLOS ONE | www.plosone.org 1 July 2013 | Volume 8 | Issue 7 | e69166.).

84. Kittner JM, Sprinzl MF, Grambihler A, et al. Adding pegylated interferon to a current nucleos(t)ide therapy leads to HBsAg seroconversion in a subgroup of patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2012;54:93–5.
85. Kosinska AD, Zhang E, Johrden L. et al. Combination of DNA prime - adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model. *PLoS Pathog.* 2013;10:e1003391. doi: 10.1371/journal.ppat.1003391.
86. Kotenko SV et al. IFN-Is mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunol.* 4, 69–77 (2003).
87. Krastev Z. (лична комуникация)
88. Krastev Z., Antonov K., Jelev D., The Prevention of an Expected Hepatic Flare in HBe negative Patients after Lamivudine Discontinuation *J Gastrointestin Liver Dis* December 2006 Vol.15 No 4, 389-391
89. Krastev Z., Antonov K., Vassilev M., Jelev D., Treatment with low-dose interferon-alpha in Bulgarian HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B. *J Clin Gastroenterol.* 1998;27:367-368.
90. Krastev Z, Jelev D, Antonov K. Long-term supportive cyclical re-treatment in HBeAg-negative IFN responders. *J Hepatol.* 2005;42:277-278.
91. Krastev Z, Jelev D, Ivanova A et al. Maintenance Peginterferon alfa-2a treatment reduces HBsAg level in genotype D HBeAg-negative interferon responders (interim results). *J Hepatol*; 2011; 54 (Suppl. I): 729.
92. Krastev Z, Nikolova N, Jelev D et al. Inosine pranobex (isoprinosine) - a potential adjuvant in the management of chronic HBV infection, issue 1, 2015 (под печат).
93. Krastev Z, Tchernev K, Petrova D et al, Bulgarian Society of Gastroenterology. An open label, multicenter, national non-randomized study

to evaluate efficacy and safety of Peginterferon alfa-2a (40 KD) in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: preliminary results. *Bulgarian Hepatogastroenterol.* 2006; 2: 90–91

94. Kumar D, Farrell GC, Fung C et al. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology* 2002; 36: 1266-1272.

95. Lagging M, Askarieh G, Negro F et al. Response Prediction in Chronic Hepatitis C by Assessment of IP-10 and IL28B-Related Single Nucleotide Polymorphisms

96. Lagging M, Romero A, Westin J et al IP-10 Predicts Viral Response and Therapeutic Outcome in Difficult-to-Treat Patients With HCV Genotype 1 Infection, *HEPATOLOGY*, December 2006

97. Lampertico P, Colombo M, Brunetto MR et al. Add-on Peginterferon Alfa-2a significantly reduces HBsAg levels in chronic hepatitis B, HBeAg-negative, genotype D patients fully suppressed on nucleot(s)ide analogues treatment: HERMES Study Interim Analysis. Late-Breaking Poster presented at AASLD November, 2014, Boston, USA.

98. Lampertico P, Viganò M, Di Costanzo, G et al. Extended (2 years) treatment with peginterferon alfa-2a (40KD) improves sustained response rates in genotype D patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2010; 52 (Suppl. 1): S45.

99. Lampertico P, Viganò M, Di Costanzo GG et al. PegBeLiver Study Group. Randomised study comparing 48 and 96 weeks peginterferon α -2a therapy in genotype D HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Gut.* 2013 Feb;62(2):290-8

100. Levin J., Correlation Between HBV cccDNA And HBsAg Levels And Their Reduction By Peginterferon Alfa-2a-Based Therapy In Patients With Chronic Hepatitis B, 2008, AASLD

101. Levrero M, Eradication of HBV: can we eliminate cccDNA, dec 2011, hepDAA
102. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection J Hepatol. 2009 Sep;51(3):581-92. doi: 10.1016/j.jhep.2009.05.022. Epub 2009 Jun 10
103. Levrero M., The epigenetic regulation of cccDNA: lessons for HBV cure, 06.2014
104. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC et al. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. Hepatology 2005, 42:987-1000
105. Liaw YF, Jia JD, Chan HL et al. Shorter durations and lower doses of peginterferon alfa-2a are associated with inferior hepatitis B e antigen seroconversion rates in hepatitis B virus genotypes B or C. Hepatology. 2011; 54: 1591–9.
106. Lin CC, Liu WH, Wang ZH et al. Vitamins B status and antioxidative defense in patients with chronic hepatitis B or hepatitis C virus infection. Eur J Nutr. 2010 Dec 24
107. Lin LY, Wong VW, Zhou HJ et al., Relationship between serum hepatitis B virus DNA and surface antigen with covalently closed circular DNA in HBeAg-negative patients. J Med Virol. 2010 Sep;82(9):1494-500. doi: 10.1002/jmv.21863)
108. Lok AS, J Gastroenterol Hepatol. Does antiviral therapy for hepatitis B and C prevent hepatocellular carcinoma? 2011 Feb;26(2):221-7. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06576.x.
109. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. HEPATOLOGY 2007;45:507-539).
110. Lopes, A. et al. Mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. J. Clin. Invest. 2008, 118, 1835-1845

111. McCarthy J, Li J, Thompson A et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 2010; 138: 2307–14.)
112. Manesis EK, Hepatitis B surface antigen: Relation to hepatitis B replication parameters in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* Volume 55, Issue 1, July 2011, Pages 61–68
113. Manesis EK et al., Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from HBsAg levels., 2007 International Medical Press
114. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa 2b plus ribavirin for initial treatment for chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet*. 2001 Sep 22;358(9286):958-65
115. Marabita F, Aghemo A, De Nicola S et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection.
116. Marcellin P, Buti M, Krastev Z et al., Kinetics of hepatitis B surface antigen loss in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B treated with tenofovir disoproxil fumarate, *J Hepatol*. 2014 Jul 18. pii: S0168-8278(14)00518-2.
117. Marcellin P, Curescu MG, Piekarska A et al. Outcome of Treatment with Peginterferon alfa-2a (40KD) in HBeAg-positive and HBeAg-negative Patients with Chronic Hepatitis B (CHB) in the Real-World: Interim Analysis of Data from the Large European S-Collate Cohort, 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases Washington, DC Nov 1-5 2013
118. Marcellin P, Lau GK, Bonino F et al., Peginterferon Alfa 2a HBeAg-negative chronic hepatitis B study group. Peginterferon alfa-2a alone,

Lamivudin alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004 351:1206-1217

119. Marcello T et al. Interferons α and λ inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 131, 1887–1898 (2006).

120. Martin CM, Welge JA, Shire NJ et al. Cytokine expression during chronic versus occult hepatitis B virus infection in HIV co-infected individuals; Cytokine

121. Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, et al. (2010) IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis* 202: 1749–1753.

122. Matthew A., Jeremie D.m Stanislas P. Plasmacytoid dendritic cells move down on the list of suspects: In search of the immune pathogenesis of chronic hepatitis C. *J of Hepatol.* 2008.49: 1069-1078

123. Milano S. et al., Effect of isoprinosine on IL-2, IFN- γ and IL-4 production in vivo and in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1991;13:1013-1018.

124. Mihm U., Welker M.W, Teuber G. et al. HCV viral kinetics during ribavirin monotherapy: results of a randomized partially double blind placebo controlled clinical trial, *Journal of Hepatology* 2011 vol. 54 | S61–S20

125. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, et al: Involvement of the PA28 Dependent Pathway in Insulin Resistance induced by Hepatitis C Virus Core Protein. *J Virol* 2007, 81(4):1727-1735

126. Mohr R., Boesecke C., Wasmuth J., Hepatitis B, *Hepatology* 2014 (p 35-47)

127. Moraes Coelho HS, Villela-Nogueira CA. Predictors of response to chronic hepatitis C treatment. *Ann Hepatol.* 2010;9 Suppl:54-60.

128. Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y. et al., Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice, *Journal of General Virology* (1997), 78, 1527–1531. Printed in Great Britain
129. Moucari R, Martinot-Peignoux M, Mackiewicz V et al., Influence of genotype on hepatitis B surface antigen kinetics in hepatitis B e antigen-negative patients treated with pegylated interferon-alpha2a. *Antivir Ther.* 2009;14(8):1183-8. doi: 10.3851/IMP1458.
130. Moucari R et al., Early serum HBsAg drop: a strong predictor of SVR to Pegilated-IFN alfa 2a in HBeAg-negative patients., *Hepatology*, Vol.49, No. X, 2009
131. Nicoara E, Crisan AI, Possibilities to modulate the immune response during infections, *TMJ* 2003, Vol. 53, No. 3-4
132. Nikolova N, JeleV D, Antonov K, Krastev K Inosine pranobex can enhance HBeAg-loss during long-term Tenofovir treatment, University Hospital “St.Ivan Rilski” – Sofia, Clinic of gastroenterology, Bulgaria; poster presentation, EASL, Lyon, Nov 2013
133. Nikolova N, JeleV D, Antonov K, Krastev K HBsAg level after consecutive add-on peginterferon-alfa 2a and inosine pranobex in long-term responder to lamivudine, Paper presented at: European Gastro Update (1st European Update congress in Gastroenterology May 16-17, 2014; Vienna, Austria (e-poster).
134. Nikolova N, Antonov K, JeleV D, et al. Natural course of HCV RNA. The paradigm of 5 log? Abstract 53 (poster presentation), *Falk Symposium* 2012;186: 5-6.
135. Nouredin M; Rotman Y; Feld J et al., Effects of Ribavirin Monotherapy on ALT, HCV Viral Levels, Serum Cytokines, and Hepatic Interferon - Stimulated Gene Expression in Chronic Hepatitis C, *AASLD 61th Annual Meeting*, Boston, MA, October 30-November 3, 2010

136. Ogbomo H, Michaelis M, Altenbrandt B et al. A novel immunomodulatory mechanism of ribavirin in suppressing natural killer cell function, *Biochemical Pharmacology* (2008), doi:10.1016/j.bcp.2009.07.026
137. Ouzan D, Péñaranda G, Joly H, Khiri H, Pironti A, Halfon P. Add-on peg-interferon leads to loss of HBsAg in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis and HBV DNA fully suppressed by long-term nucleotide analogs. *J Clin Virol.* 2013; 58(4):713-7.
138. Pal S, Polyak SJ, Bano N, et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastro Hepatol* 2010, 25(3):327-634
139. Pár A, Beró T, Brasch G et al. Isoprinosine therapy in chronic hepatitis C (multicenter placebo-controlled double-blind prospective study)] *Orvosi hetilap* 134:19 1993 May 9 pg 1015-9
140. Pardo M, Carreño V, Lack of efficacy of inosine pranobex in the treatment of chronic hepatitis C *Journal of Hepatology*, Volume 21, Issue 2, Page 278, 1994
141. Parvaiz F. , Manzoor S., Tariq H., Hepatitis C Virus Infection: Molecular Pathways to Insulin resistance, *Virology Journal* 2011, 8:474
142. Pawlotsky JM., Bouvier AM, Hezode C. et al. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology.*2000;32;654-659
143. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral – related steatosis. *FASEB J* 2002; 16: 185-19
144. Petrova M, JeleV D, Ivanova A, Krastev K. Isoprinosine affects serum cytokine levels in healthy adults. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the international society for interferon and cytokine research* Vol. 30 Issue 4 Apr 2010

145. Petersen J, Dandri M, Mier W. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein
Nature Biotechnology 26, 335 - 341 (2008)
Published online: 24 February 2008 | doi:10.1038/nbt1389
146. Pilli M, Zerbini A, Penna A, et al. HCV-specific T-cell response in relation to viral kinetics and treatment outcome (DITTO-HCV project).
Gastroenterology 2007; 133:1132– 43.
147. Piratvisuth T, Marcellin P, Popescu M et al. Hepatitis B surface antigen: association with sustained response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e antigen-positive patients. Hepatol Int. 2013; 7 (2): 429-436.
148. Pollicino T, Saitta C, Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma). World J Gastroenterol 2014 May 28; 20(20): 5951-5961 ISSN 1007-9327
149. Pollicino T, Saitta C, Raimondo G. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus. Carcinogenesis 2011;32:1122–1132.
150. Popescu C, Dubuisson J, Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry Biol. Cell (2010) 102, 63–74 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BC20090125
151. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2008;49:652–657.
152. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. Gastroenterology 2010;138:1338-45. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.056.
153. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M, Kohrgruber N. et al. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts

hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. 2008;13(8):969-76.)

154. Reijnders JG, Rijckborst V, Sonneveld MJ, et al. Kinetics of hepatitis B surface antigen differ between treatment with peginterferon and entecavir. *J Hepatol* 2011;54:449–454.

155. Rijckborst V, Hansen BE, Cakaloglu Y et al. Early on-treatment prediction of response to peginterferon alfa-2a for HBeAg-negative chronic hepatitis B using HBsAg and HBV DNA levels. *Hepatology*. 2010;52: 454–61.

156. Rijckborst V, Hansen BE, Ferenci P et al., Validation of a stopping rule at week 12 using HBsAg and HBV DNA for HBeAg-negative patients treated with peginterferon alfa-2a., *J Hepatol*. 2012 May;56(5):1006-11. doi: 10.1016/j.jhep.2011.12.007. Epub 2012 Jan 13.

157. Robin X., V. Durcos, M. Hilleret et al. Hyperhomocysteinemia in chronic hepatitis C: role in steatosis, fibrogenesis and response to antiviral treatment. *J. Hepatol.*, 46,suppl. 1, 2007, s209.

158. Rotman Y, Noureddin M, Feld JJ et al. Effect of ribavirin on viral kinetics and liver gene expression in chronic hepatitis C, *Gut*. 2013 Feb 8.

159. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P et al. The natural history of compensated, cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients

160. Sarin SK, Kumar M, Hissar S et al Combination of pegylated interferon and lamivudine for patients with chronic hepatitis B who have failed treatment *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006 Aug;5(3):374-80

161. Schulof RS, Parenti DM, Simon GL et al., Clinical, virologic, and immunologic effects of combination therapy with ribavirin and isoprinosine in HIV-infected homosexual men. *Acquir Immune Defic Syndr*. 1990;3(5):485-92.

162. Shavinskaya A, Boulant S, Penin F et al (2007) The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J. Biol. Chem.* 282, 37158–37169
163. Shiffman M, Hofmann C, Sterling R et al., A randomized, controlled trial to determine whether continued ribavirin monotherapy in hepatitis C virus–infected patients who responded to interferon-ribavirin combination therapy will enhance sustained virologic response , *The Journal of Infectious Diseases* 2001;184:405–9
164. Sievert W, Dore GJ, McCaughan GW et al. Virological response is associated with decline in hemoglobin concentration during pegylated interferon and ribavirin therapy in hepatitis C virus genotype 1, *Hepatology*. 2011 Apr;53(4):1109-17. doi: 10.1002/hep.24180.
165. Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T et al. Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. *Hepatology*. 2013 Sep;58(3):872-80. doi: 10.1002/hep.26436. Epub 2013 Jul 29
166. Stevenson NJ, Murphy AG, Bourke NM et al. (2011) Ribavirin Enhances IFN- α Signalling and MxA Expression: A Novel Immune Modulation Mechanism during Treatment of HCV. *PLoS ONE* 6(11): e27866. doi:10.1371/journal.pone.0027866
167. Sulkowski M., Mitchell L, Nezam S. et al. Decline in Hemoglobin Is Associated with Sustained Virologic Response (SVR) Among HCV Genotype 1-Infected Persons Treated with Peginterferon (PEG)/Ribavirin (RBV): Analysis from the Ideal Study, *Gastroenterology*, May 2009 Volume 136, Issue 5, Supplement 1, Pages A-790–A-791
168. Su TH, Liu CJ, Tseng TC et al. Longitudinal change of HBsAg in HBeAg-negative patients with genotype B or C infection. *PLoS One*. 2013;8(2):e55916. doi: 10.1371/journal.pone.0055916.Epub 2013 Feb

169. Thomas D, Thio C, Martin M, Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus, NATURE| Vol 461|8 October 2009
170. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC et al. (2012) Determinants of spontaneous surface antigen loss in hepatitis B e antigen-negative patients with a low viral load. *Hepatology* 55: 68–76
171. Tseng TC, Kao JH, Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog, *J Gastroenterol.*2012 Oct 24.
172. Uprichard S, Wieland S, Althage A et al. Transcriptional and posttranscriptional control of hepatitis B virus gene expression, December 18, 2002
173. Urban T, Thompson A, Bradrick S, et al IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010;52:1888-96. doi:10.1002/hep.23912.
174. Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV, HBeAg-negative chronic hepatitis B: why do I treat my patients with pegylated interferon-alfa? *Liver Int.* 2014 Feb;34 Suppl 1:127-32. doi: 10.1111/liv.12404.
175. Werner JM, Serti E, Lotrea X. Et al., Ribavirin Pretreatment Improves the IFN- γ Response of Natural Killer Cells to IFN-based Therapy of Hepatitis C Virus Infection;*Z Gastroenterol* 2014; 52 - P_5_41; DOI: 10.1055/s-0033-1361050,
176. Willemse S.B., Reesink H.W., Ladee K. et al. IP-10 in chronic hepatitis C patients treated with high-dose interferon the Netherland journal of medicine, October 2014, vol. 72, no 8
177. Wursthorn K. Et al., Kinetics of hepatitis B surface antigen decline during 3 years of telbivudine treatment in hepatitis B e antigen–positive patients. *Hepatology*, 52(2010): 1611–1620. doi: 10.1002/hep.23905

178. Yang X, Tang XP, Lei JH, Luo HY, Zhang YH. A novel stop codon mutation in HBsAg gene identified in a hepatitis B virus strain associated with cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1516-1520
179. Yasuhito M, Nishida T., Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors *Journal of Hepatology*, Volume 54, Issue 3, Pages 439–448, March 2011
180. Yen CL, Chang JJ, Lee TS et al. Ribavirin monotherapy increases sustained response rate in relapsers of end treatment virologic responders, *World J Gastroenterol* 2005;11(11):1663-1667
181. Ying Ch, Johnny S, Ming-Liang H, HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage, ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R *World J Gastroenterol* 2004 January 1;10(1):82-85
182. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M, et al. Intrahepatic levels of CXCR3 associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2008 Nov;48(5):1440-50.
183. Zoulim F Antiviral therapy of chronic hepatitis B: can we clear the virus and prevent drug resistance?, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 15:299–305, 2004
184. Zoulim F, Are novel combination therapies needed for chronic hepatitis B? *Antiviral Res.* 2012 Nov;96(2):256-9. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.09.006. Epub 2012 Sep 19.
185. Zoulim F, Haem J, Ahmed SS, Ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C: a retrospective study of 95 patients. *J Viral Hepat.* 1998 May;5(3):193-8

186. Zoutendijk R, Hansen BE, van Vuuren AJ, et al. Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss. *J Infect Dis* 2011;204:415–18.

