

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ

УМБАЛ „СВ. ИВАН РИЛСКИ”

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

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

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

Дисертационният труд е написан на 130 печатни страници, онагледен с 18 фигури и 26 таблици. Библиографията съдържа 186 заглавия, от които 9 на кирилица и 177 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд за реализирани 5 публикации и 9 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрения съвет на Катедра по вътрешни болести при Медицински университет - София на 24.02.2015г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р Людмила Матева Владимирова, дмн – вътрешен член за МУ – София, Катедра по вътрешни болести на Медицински факултет при МУ- София, научен ръководител на докторанта
2. Доц. д-р Асен Ненов Асенов, дм - вътрешен член за МУ – София, Катедра по вътрешни болести на Медицински факултет при МУ-София
3. Проф. д-р Крум Сотиров Кацаров, дмн – външен член за МУ – София, Военномедицинка Академия-София
4. Проф. д-р Захарий Александров Кръстев, дмн - външен член за МУ – София, пенсиониран преподавател повече от пет години от академичния съвет на Медицински факултет при МУ-София
5. Доц. д-р Иванка Пенчева Маринова, дм - външен член за МУ – София, Медицински университет – Плевен

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

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 9.06.2015 г. от 13.00 часа в Аулата на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” ЕАД- гр. София, бул. Акад. Иван Гешов 15.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения .....	3 стр.
Въведение.....	6 стр.
Цел и задачи.....	9 стр.
Материал и методи.....	10 стр.
Резултати .....	15 стр.
Изводи.....	48 стр.
Приноси .....	49 стр.
Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд.....	50 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

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-х – 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)

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. „спираци правила”, при интерфероновото (IFN) лечение

на хроничния хепатит В. Те обаче все още не са залегнали 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 лекрства 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. 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.

## IV. 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.

От пациентите с генотип 1 - 34 са жени и 45 – мъже, на възраст 40,9 (средна), 40 (медиана)  $\pm 11,97$ , от 19 до 62. От пациентите с генотип 3 хронична HCV инфекция 6 са жени и 11 – мъже, на възраст  $31 \pm 4,01$  (медиана), от 22 до 39 г.

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.

**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. 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- afla 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. 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. 13). 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. 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.

## **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;
- 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)

- 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 и за HBeAg/anti-HBe статуса
- 4) **Електрохимулюминисцентен имунологичен тест** - за количествено определяне нивото на повърхностния антиген на хепатит В (HBsAg).
- 5) **Течна хроматография-мас спектрометрия** за определяне на серумни нива на витамин D.
- 6) **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, АЛАТ, АСАТ, ГГТ, АФ, билирубин, ПКК.

•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.

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

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;  $\chi^2$ ; 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  $p < 0.05$ .

## V. РЕЗУЛТАТИ

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

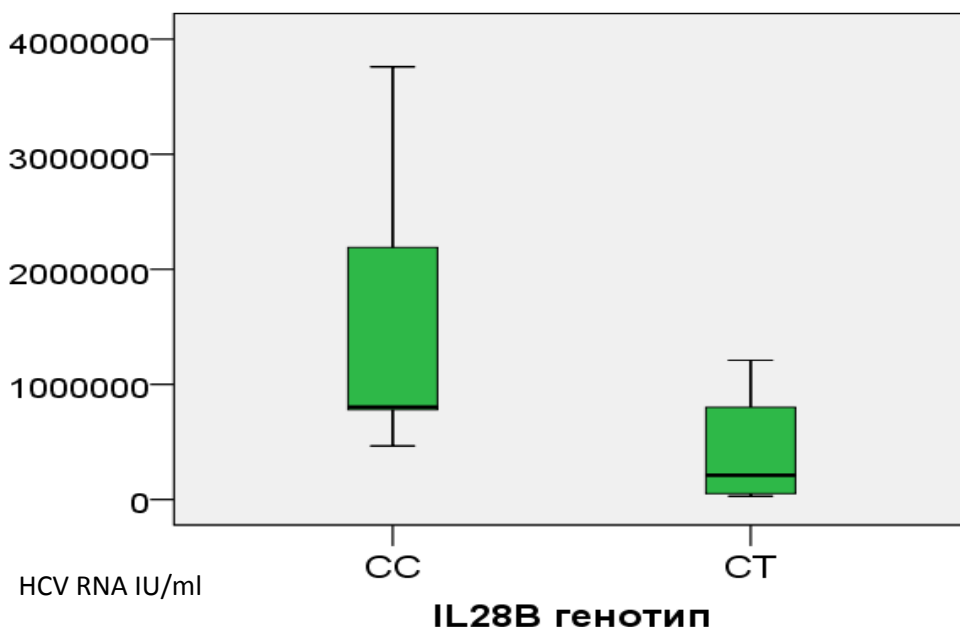
#### Пациенти с хронична HCV инфекция, генотип 3

Петнадесет от 17-те пациенти с генотип 3, 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 имат постигнат 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 виремия, 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 antiHVCor-total антитела и степента на фиброза ( $r = -0.822$ ,  $p = 0.001$ ). Като при пациентите с позитивни antiHVCor-total антитела степента на фиброза е по-висока. Установява се корелация между IL28B генотипа и виремията ( $r = -0.625$ ,  $p = 0.022$ ) – пациентите с генотип C/C (всички 5 пациенти) са с по-висока виремия ( $> 400\,000$  IU/ml). Има статистически значима разлика между нивата на изходната виремия при пациентите с генотипове C/C и C/T ( $p = 0.045$ , Mann-Whitney – непараметричен анализ) (фиг. 1).

**Фигура 1. Статистическа разлика между изходната виремия 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 ( $p=0.004$  и  $p=0.029$  съответно).

### **Пациенти с хронична HCV инфекция, генотип 1**

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.

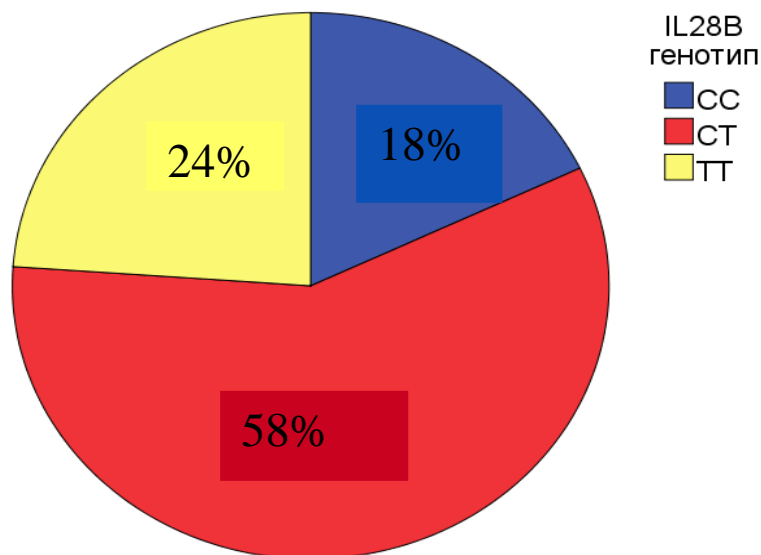
При 41 (52%) от 79-те пациенти, генотип 1, се постигна ТВО след стандартна двойна терапия с Рибавирин и Рег-IFN. При 20 от пациентите без ТВО е налице рецидив. При 12 пациенти – липсва отговор (на трети месец от лечението (т.е. без отговор) или е налице спад с повече от 2 log спрямо изходната виремия, но на 6-ти месец виремията не е негативна (частично отговорили). При 6 пациенти липсват данни за ТВО 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 вирусния товар с 2 log или повече.

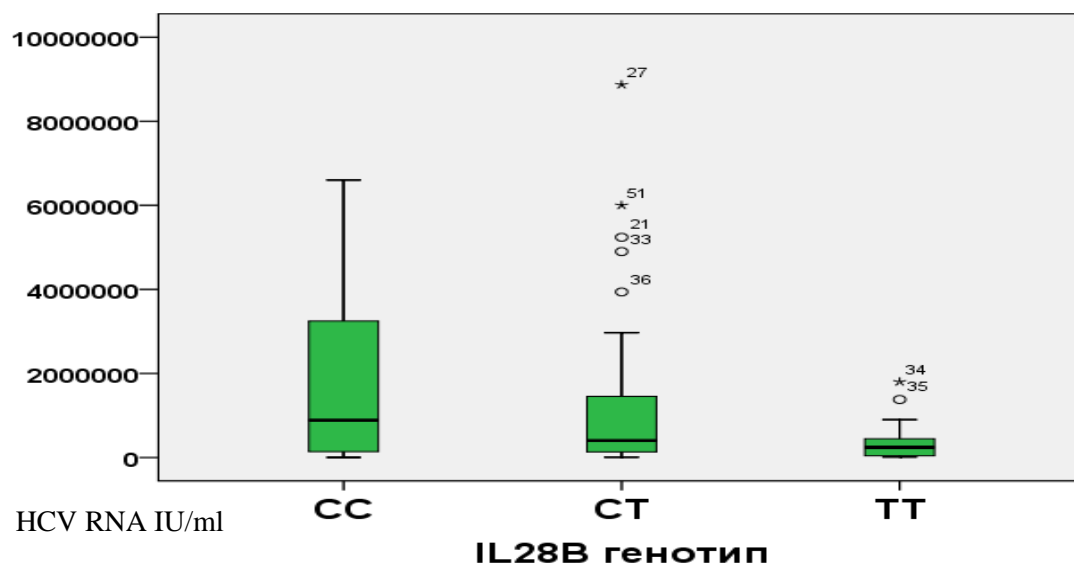
При 67 пациенти имахме изследван генотип на IL28. При 12 пациенти се установи генотип C/C при 39- C/T и при 16 – T/T (Фиг. 2);

**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 (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 вирусния товар при пациентите с хронична HCV инфекция генотип 1, според IL28 В генотипа**



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

#### Пациенти с RVR:

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

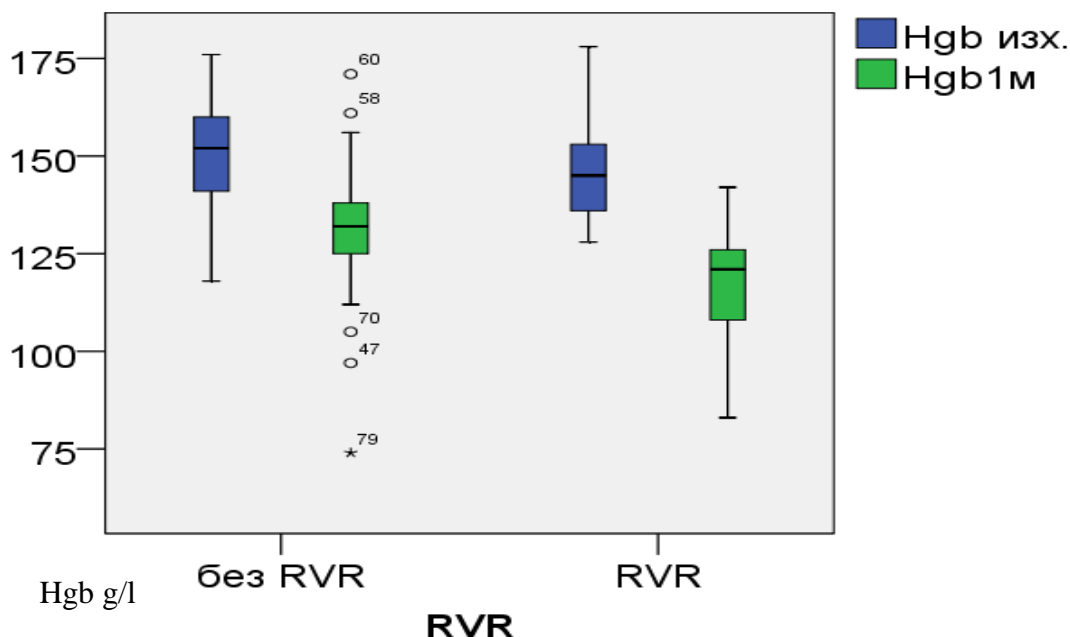
Установихме негативна корелация между изходните нива на ГГТ и постигането на RVR ( $p=0.001$ ,  $r=-0.354$ ). Като при пациентите, при които няма постигнат RVR, нивата на ГГТ са по-високи ( $p=0.000$ ).

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 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. 4).

**Фигура 4. 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

- C/C – 10 пациенти; C/T - 22; T/T- 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 T/T 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 вирусемия 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 C/C, а останалите от т.нар. неблагоприятни генотипове – C/T (17), T/T (8).

Пациентите с липса на отговор, 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 T/T, а при 6 – C/T. Няма пациенти без ранен вирусологичен отговор, които да са с генотип C/C.

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.

Пациентите с рецидив на инфекцията, са на възраст 50 години (медиана), 19-60. При половината е налице анемия на 4-седмица от лечението. Двама пациенти с с генотип C/C, 11- с C/T, и 4 – T/T. При 11/20 – виремията е над 400 000, а при 6-ма  $\leq 400\ 000$ . При половината пациенти дозите 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, 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

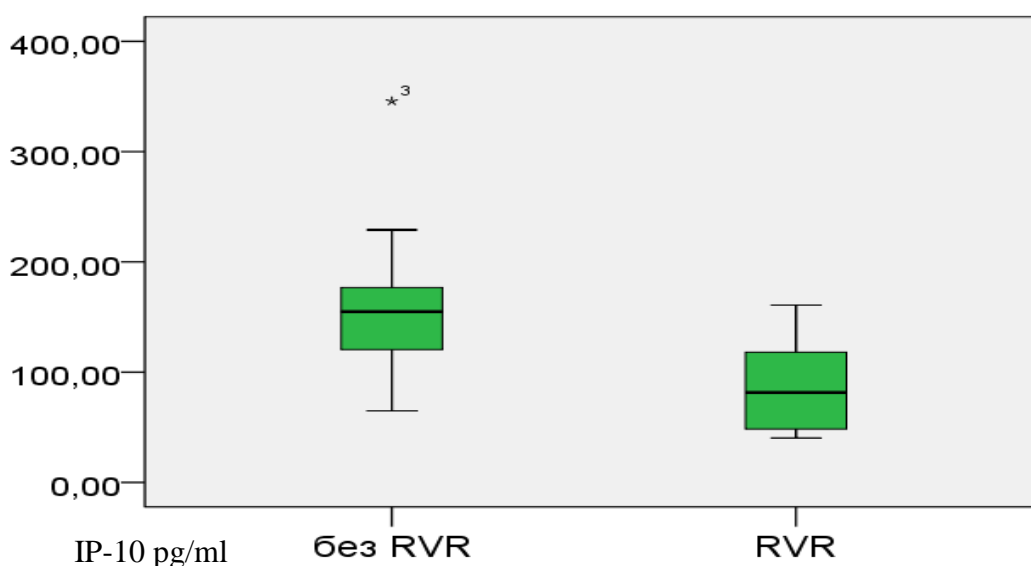
## IP-10

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. 5).

**Фигура 5. IP-10 изходни нива при пациенти с постигнат и без постигнат RVR**



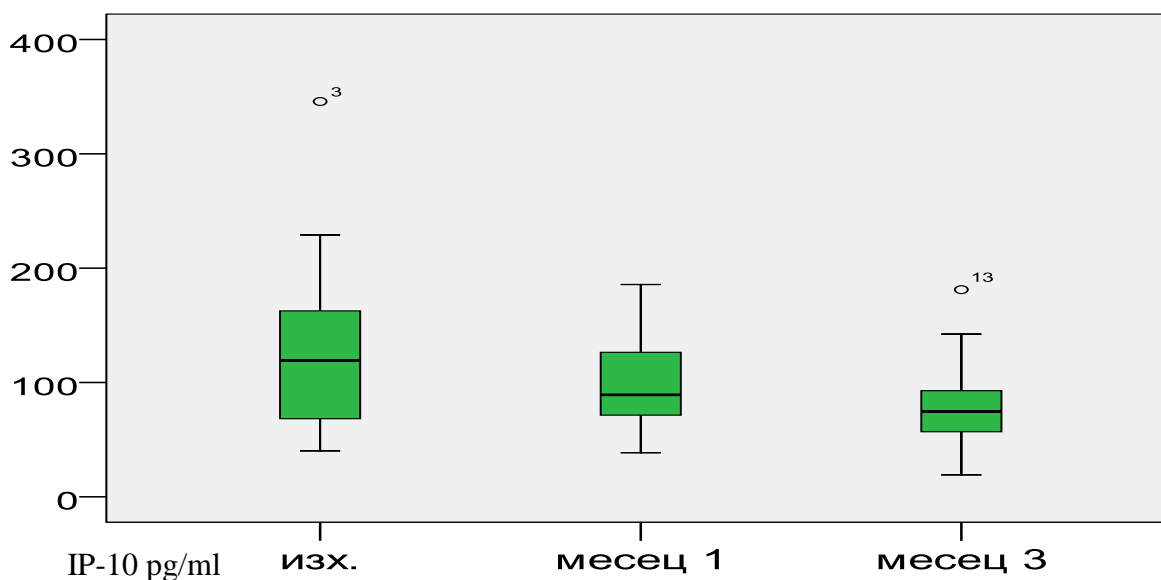
Девет от 10 пациенти, които постигат RVR имат изходни стойности на IP-10 под 150 pg/ml.

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.1, Фиг.6). Докато при пациентите с RVR нивата остават сравнително стабилни (медиана <150 pg/ml).

**Таблица 1. 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-ти 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 6. 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 по-ниските 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**

Установиха се значими корелации между изходните стойности на IP-10 с изходни стойности на ASAT и GGT (Табл. 2).

**Таблица 2. 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.**

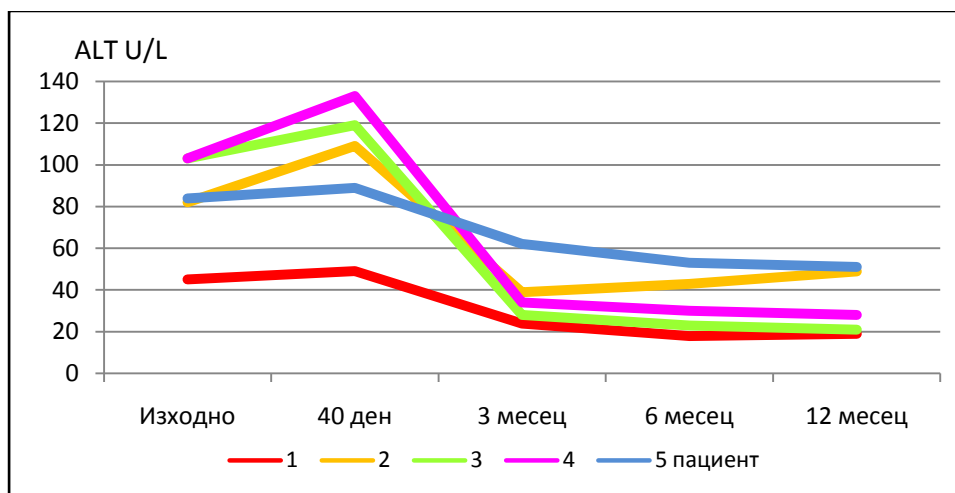
Изходните нива на HCV RNA, ALT и IP-10 са показани в табл.3. Всички пациенти имаха високи нива на IP-10 ( $>150\text{pg/ml}$ ) и повишени аминотрансферази.

**Таблица 3. 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 U/L	84 /45-103/
IP-10 pg/ml	365 /274-501/

По време на лечението наблюдавахме първоначално леко повишаване на АЛТ на 40-ти ден при всички пациенти ( $p=0.043$ ). При 4/5 пациенти нивата на АЛТ намаляват в последствие и влизат в нормални граници на 3 месец ( $p=0.043$ ). При последния пациент нивата на АЛТ се понижават, спрямо изходните, но не достигат нормални стойности (фиг.7.). Установява се статистически значима разлика между изходните нива на АЛТ 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/.

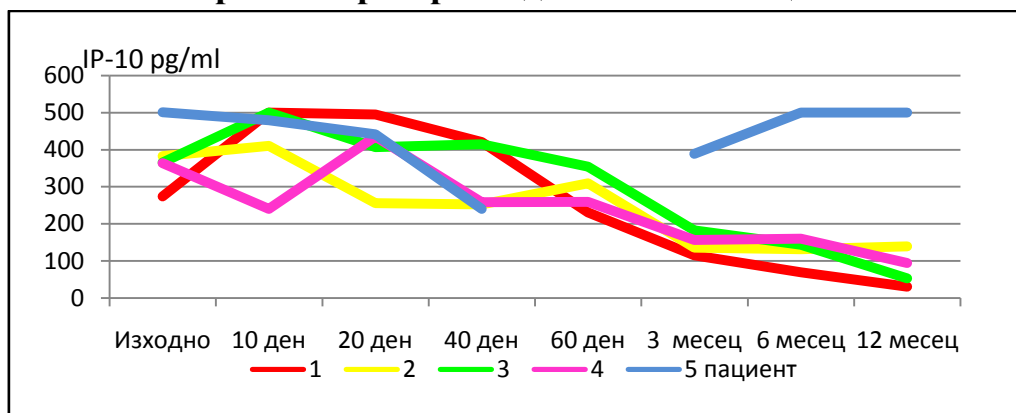
**Фигура 7. Серумни нива на АЛТ по време на терапевтичния режим**



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 редуция на 60-ти ден, но като цяло нивата остават стабилни по време на лечението (Фиг.8)

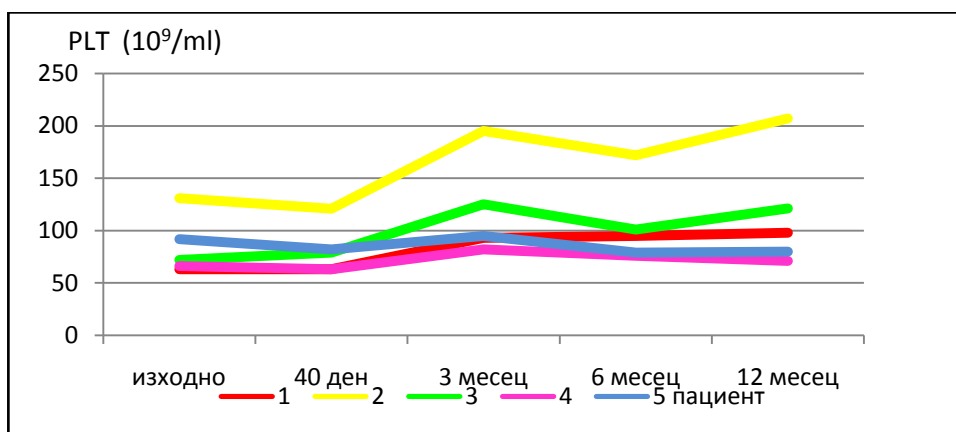
**Фигура 8. IP-10 нива по време на Isoprinosine – Ribavirin терапевтичния режим при проследените 5-ма пациенти**



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 редуция 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.9).

**Фигура 9. 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.

### 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 4.

**Таблица 4. Серумни нива на витамин Д, спрямо отговора на лечение.**

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

Повечето от нашите пациенти (16/20) са със субоптимални нива или недостатъност, които не са свързани с отговора. Не се установява значима корелация между нивата на витамин Д и постигане на RVR ( $p=0.241$ ) и ТВО ( $p=0.844$ ).

### **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 ТВО ( $p>0.05$ ). 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.**

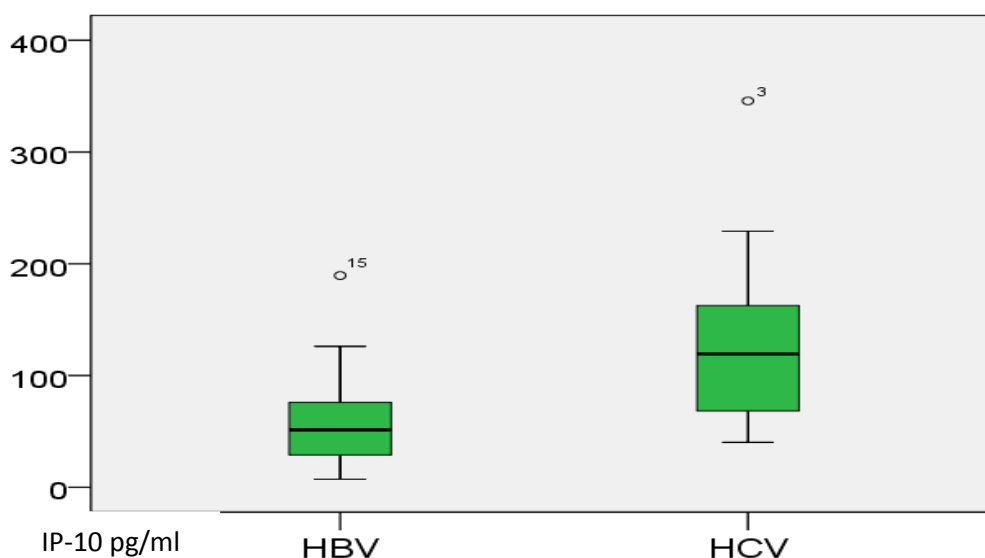
При 19 пациенти с хронична HBV инфекция на терапия с NUC и при 10 от проследените пациенти с хронична HBV инфекция на терапия с Peg-INF-alfa 2a бяха проследени нивата на IP-10 изходно и 3-ти месец.

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 или IFN). Не се установява статистически значима разлика между изходните стойности на IP-10 при HBeAg +/- и +/- пациенти, както и между пациенти с негативна вирусемия на трети месец и такива с налична вирусемия. Няма статистически значима разлика при пациенти с цироза и пациенти с ХХВ (при пациентите на терапия с NUC).

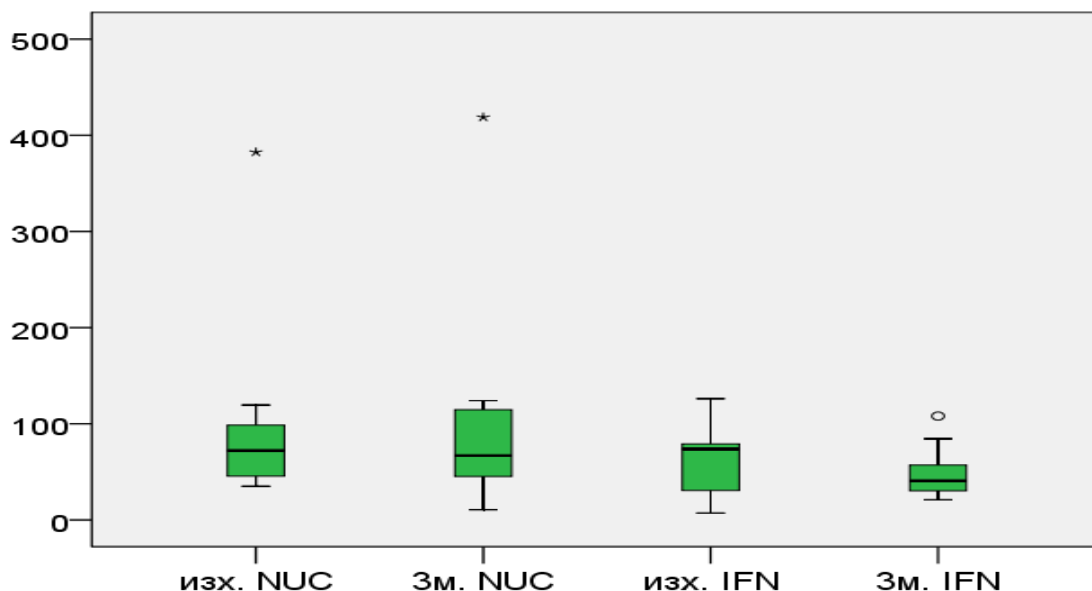
Изходните нива на IP-10 при пациентите с С хепатит са 2 пъти по-високи от тези при пациентите с хронична В инфекция ( $p=0.002$ ) (фиг.10).

### Фигура 10. 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 (фиг.11).

**Фигура 11. IP-10 по време на лечение с IFN или NUC**



**5. Количествен HBsAg при HBeAg-позитивни и HBeAg негативни пациенти в хода на терапия с нуклеозидни аналози или Peg-interferon-alfa-2a.**

#### Пациенти на терапия с NUC

Изходните нива на HBsAg при HBeAg-позитивните пациенти бяха три пъти по-високи в сравнение с HBeAg–негативните пациенти (Табл.5).

**Таблица 5. 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
ALAT [U/L]	40 (25-186)	79 (17-482)	0.552

\*Mann-Whitney–непараметричен анализ

#### Резултати при HBeAg (+) пациенти на лечение с NUC

**Таблица 6. Количествен HBsAg, HBV DNA и ALT – изходни нива и по време на лечението с NUC при HBeAg (+) пациенти.**



П а ц.	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
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 ( $p>0.05$ ).

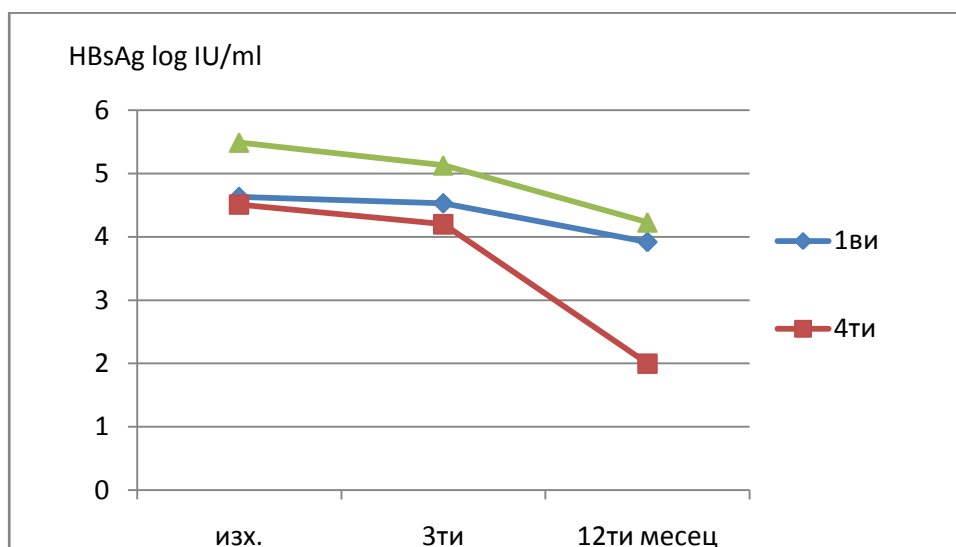
По време на лечението серумните HBV DNA нива прогресивно намаляват при всички пациент и достигат до неустановими нива на етап от лечението 3, 6, 9 и 12-ти месец при съответно 4/9, 6/9, 8/9 и 8/9 от пациентите. Не беше наблюдавана нито HBeAg-загуба, нито HBsAg-загуба или сероконверсия.

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<sup>ти</sup> месец и  $> 0,5 \log_{10} \text{ IU/ml}$  на 12<sup>ти</sup> месец) се установи при 3-ма пациенти (1<sup>ви</sup>, 4<sup>ти</sup> и 5<sup>ти</sup> пациент; Табл. 6, фиг.12). 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 редуцията 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 12. 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<sup>ти</sup> месец) се установи при 2-ма пациенти (№3 и №6) – Табл. 6

• **Бавно покачване** (непрекъснато леко покачване с >20% на 12<sup>ти</sup> месец) се установи при 2-ма пациенти (№2 и №8) – Табл. 6. При единия от тях имаше ранно повишаване на HBsAg на третия месец (№8).

• **Флукутиране на HBsAg** беше наблюдавано при 2-ма пациенти (№7 и 9); Табл. 6). 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<sup>ти</sup> месец и се повишава на 12-ти месец. И при двамата пациенти, независимо от флукутацията се наблюдава редукция на HBsAg нивата с най-малко 20% на 12-ти месец спрямо изходните.

### Резултати при HBsAg (-) пациенти на лечение с NUC

**Таблица 7. Количествен HBsAg, HBV DNA и ALT – изходни нива и по време на лечението с NUC при HBsAg (-) пациенти.**

П а ц.	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

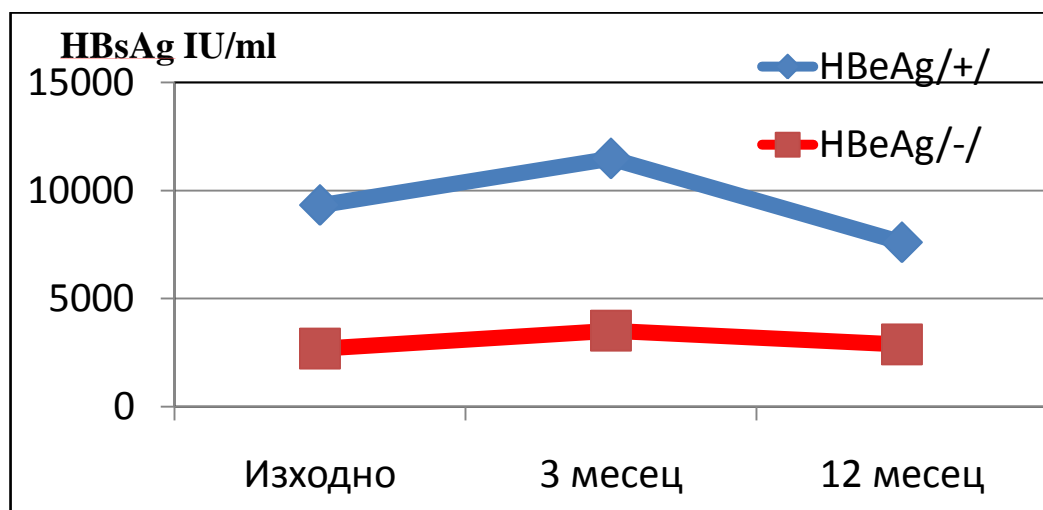
При HBeAg (-) пациенти няма статистически значима корелация между изходните нива на HBsAg и HBV DNA, както и между изходните нива на HBsAg и ALT.

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.7).

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. 7) 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<sup>ти</sup> месец (Табл. 7, фиг. 13).

**Фигура 13. Количествен HBsAg при HBeAg +/- и HBeAg -/- пациенти по време на терапия с NUC**



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<sup>ти</sup> месец от лечението при пациенти лекувани с Tenofovir и Entecavir.

### **31 пациенти - с ХХВ на лечение с Peg-IFN alfa-2a**

Изходните нива на HBsAg при HBeAg-позитивните пациенти бяха около 6 пъти по-високи в сравнение с HBeAg-негативните пациенти ( $p = 0.037$ ) (табл. 8). 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. 8).

**Таблица 8. 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**

Трима от HBeAg +/- пациенти негативират HBV DNA още на 3-ти месец от лечението (пациенти № 1, 2 и 5 от табл. 9), 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-ти месец.

**Таблица 9. Серумни нива HBV DNA и HBsAg – изходно и в хода на лечение при HBeAg-позитивни пациенти.**

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 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	108 660	11572	29 540
3	337 800 000	139800	341 000 000	77308	40 260	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, HBVDNA и тяхната динамика (табл.9):

- 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 HBV DNA (> 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 последствие не се постига ТВО.

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

- и липса на спад на времиата (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 негативиране на времиата (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

**Таблица 10. 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 IU/ml	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
HbsAg IU/ml	0.313	0.253	0.020*	0.007*
ALT U/L	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 log10) (табл.11,12). Установяви 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 10).

За 24/26 от пациентите 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 IU/ml (< 10 000 cp/ml) и нормални аминотрасфери и при 6 от тези 11 пациенти HBV DNA е негативна (табл.11,12).

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

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-ти месец спадането, 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. 11)**

**Таблица 11. 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
7	30200	10590	221	5458	0	1714	0	1158	0	813	1220
8	3090000	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	1862000	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	3340000	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 терапията (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 UI/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 б.).

## **В. HBeAg- негативни пациенти с повишаване или липса на промяна на HBsAg на трети месец, спрямо изходните нива (табл. 12)**

**Таблица 12. 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 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	
1	7770000	5820	55962	12648	41923	10103	298000	8311	21960000	8872	6800000
4	24500	4754	41	4705	0	3976	0	3155	0	2797	12000000
5	43800	5470	0*	6268	30	6776	0	5796	0	4231	38000
6	1390000	4148	0	4346	0	1417	0	92	0	55	37000**
9	30080	128	0	435	0	221	0	366	0	390	1181
10	9420000	11643	36300	13000	10300	11612	742	11328	0	10605	968000
Пац.	Изходно		3-ти месец		6-ти месец		9-ти месец		12-ти месец		6 м сл.леч
11	443800	9482	28	10555	0	10186	0	9915	0	8470	6440000
12	1312000	4528	244	6053	0	6299	0	4926	0	3845	05492***
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	2970000

\*използвано за кратко, вместо неоткриваема HBV DNA

\*\* 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.12). 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 слад на HBV DNA с <2 log). От пациентите със спад на HBsAg на трети месец – при двама от тях спада на виремията на трети месец е с по-малко от 2 log, но е налице сапд на HBsAg на трети месец (№ 17 и 22).

Не се установява статистически значима разлика на изходните нива на HBsAg и HBV DNA при пациентите, които в последствие понижават или повишават ниват 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 хепатит В, HBeAg +/-, на комбинирана терапия NUC –Peg-IFN-alfa 2a**

**Таблица 13. Изходни характеристики на пациентите на комбинирана терапия Zeffix – Peg-IFN-alfa 2a.**

Пац.	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 изобразяване на неоткриваема HBV DNA

При шестима HBeAg/-/ пациенти - 3-ма мъже и 3 жени, лекувани продължително с НУК (посочен в таблицата), в последствие се включи и

Peg-IFN-alfa – 2a и Tenofovir/Telbivudine бяха заменени с Lamivudine Комбинацията беше продължена 6 месеца, като в следствие се продължи само с Peg-IFN alfa – 2a (табл.14). При започване на посочената схема вирусната титър беше негативна, докато при двамата мъже (пациент №3 и 4) имаше известен период между спирането на Тенофовир и започване на схемата и затова имаха невисока вирусна титър.

**Таблица 14. Динамика на количествения HBsAg IU/ml, при проследените пациенти.**

Пациент	Изходно	3-ти месец	6-ти месец	9-ти месец	12-ти месец	15-ти Месец	18-ти месец	21-ви 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	Спряна терапия		
4	4160	6734	5642,00	3678,00	2574,00	Спряна терапия		
5	2400	1720	915,00	733,00	210,00	Спряна терапия		
6	35744	81499	62612	54351	55000		55194	Спряна терапия

При пациент №1 и 2 терапията продължава, като се поддържат нива на HBsAg <100 IU/ml, при негативна вирусна титър при пациент 1, а при пациент 2 при изследване на 18-ти месец се установи ниска вирусна титър 300 IU/ml, но на 21-ви месец от лечението – вирусната титър беше негативна и HBsAg < 0,05 IU/ml. Терапията продължава.

При №3 и 5, терапията беше спряна по желание на пациентите. Като при пациент №3 вирусната титър е негативна 6 месеца след спиране на терапията и HBsAg е 29 IU/ml. При пациент №5 се поддържа вирусна титър под 1000 IU/ml при нормални аминотрасферази, при проследяване след края на терапията. При пациент №6 терапията беше спряна, поради липса на ефект върху нивата на HBsAg (табл.14).

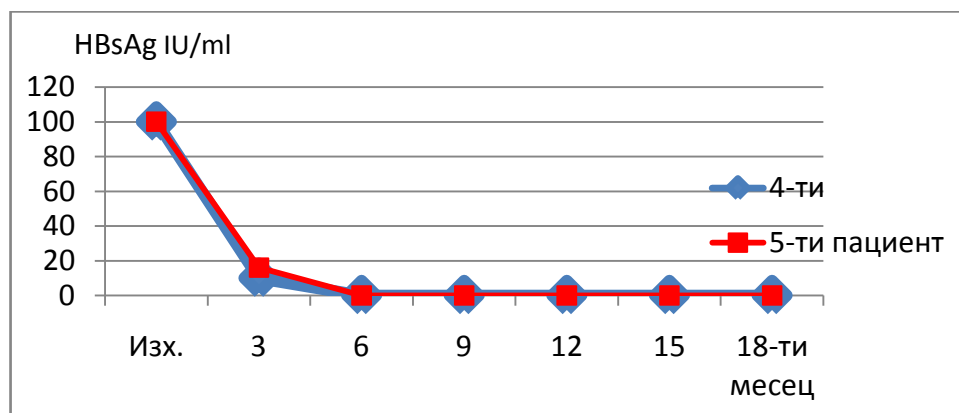
При пациент №4 -12-ти месец се появи вирусологичен пробив – вирусната е 470 000 IU/ml и терапията с Пегасис беше спряна. Започна се отново Тенофовир.

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

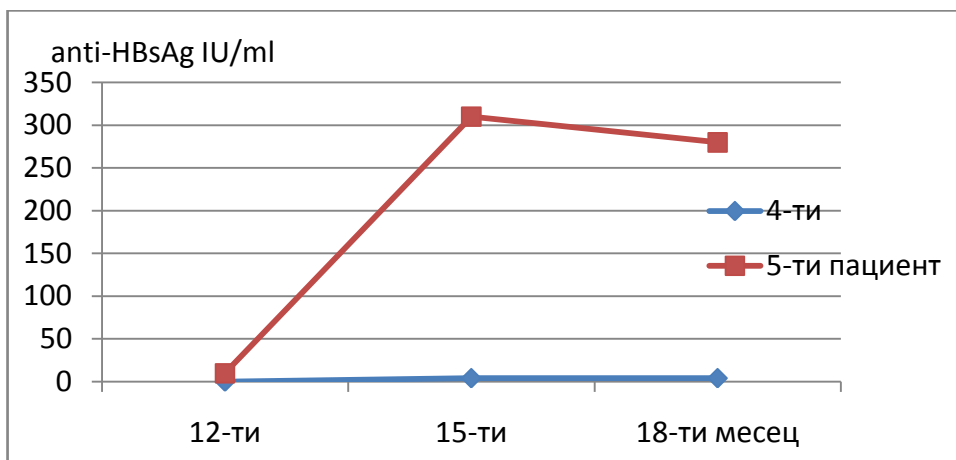
При 7 от проследените пациенти, поради значимия спад на количествения HBsAg по време на лечението (с повече от 90% и ниво на 12-ти месец под 100 IU/ml), решихме терапията да бъде удължена повече от стандартния период (повече от 48 седмици). Това са 2-ма HBeAg (+) (№4 и 5 от табл. 9) и 5-ма HBeAg(-) (№ 6 (табл. 12), 8, 18, 19 и 21 от табл.11). 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. 9 (фиг.14, фиг. 15).

#### **Фигура 14. Спад на HBsAg в процент при 2-мата HBeAg-позитивни пациенти с удължена терапия**

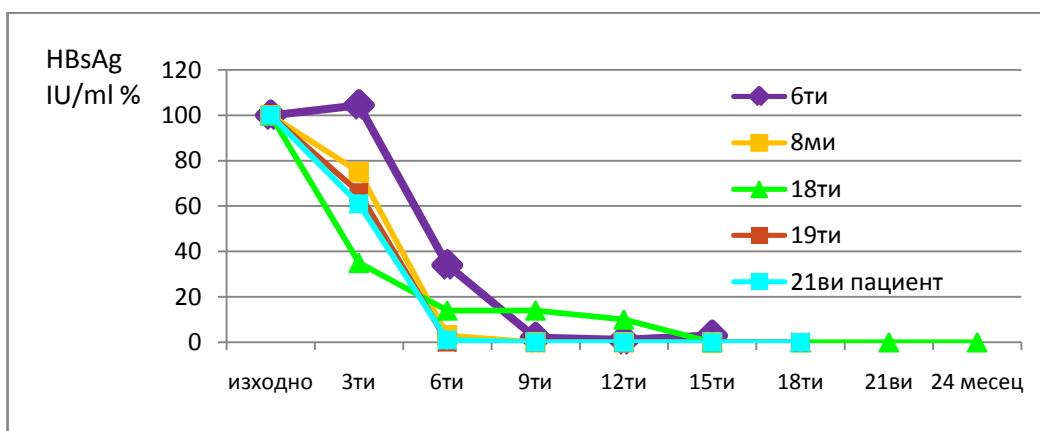


#### **Фигура 15. Титър на anti-HBsAg по време на лечение при 2-мата HBeAg-позитивни пациенти с удължена терапия**

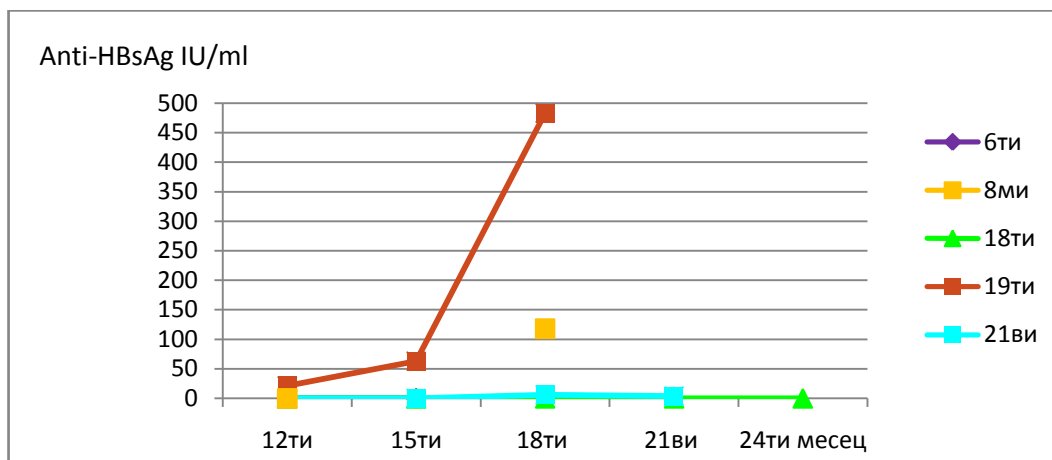


**HBsAg +/- пациенти с удължена Peg-IFN терапия (фиг. 16, фиг.17).**

**Фигура 16. Спад на HBsAg в процент при 5-мата HBsAg-негативни пациенти с удължена терапия**



**Фигура 17. Титър на anti-HBsAg по време на лечение при 5-мата HBsAg-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) (като 2 години след спиране на лечението вирусемията е под 1000 IU/ml, при нормални стойности на аминотрасферазите). А при втория, терапията още продължава, поради липса на антитела (при HBeAg<0,05 и негативна вирусемия) (пациент №18).

В последствие при проследяване на пациент № 19, шест месеца след спиране на терапията, антителата бяха спаднали до 4 IU/L и HBeAg се позитивира. Другият пациент с антитела (>100 IU/ml), не е проследяван след това, поради технически причини).



## VI. 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 (аминотрансферази) и до понижаване нивата на IP-10 до стойности <150 pg/ml, но не и до промяна на виремията.
5. HBeAg/+/ пациентите 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 усиление появата на анти-HBsAg при удължаване на терапията, повече от 48 седмици.

## **VII. 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.

## **VIII. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **Списък на научните публикации във връзка с дисертацията:**

1. Nikolova N, Antonov K, Jelev D, Mateva L, Krastev Z, The cytokine IP-10 in chronic HBV and HCV infection, Journal of IMAV, 2013 Jul-Dec;19(3):442-447 (online)
2. Nikolova N, Antonov K, Mateva L, Krastev Z, Could Inosine pranobex and Ribavirin in combination restore immune competence in chronic HCV advanced liver disease?, Midinform I S S U E 1 , 2 0 1 4, 35-44 (online).
3. Krastev Z, Nikolova N, Jelev D, Antonov K, , Mateva L, , Inosine pranobex (Isoprinosine) - A potential adjuvant in the management of chronic HBV Infection, Midinform ISSUE 1, Mar 2015; 86-97 (online)
4. Н.Николова, Особенности на хроничния HBeAg – негативен хепатит, Българска хепатогастроентерология, 2014,2 (под печат).
5. Nikolova N, Jelev D, Antonov K, Mateva L, Krastev Z, The decrease of HBsAg during nucleos(t)ide analogues therapy in Bulgarian patients, Biotechnology & Biotechnological Equipment (online), IF 0.622 (под печат).

### **Списък на научни участия в български и международни форуми, във връзка с дисертацията**

1. Nikolova N, Antonov K, Jelev D, Ivanova A, Mateva L, Krastev Z, "RVR in chronic hepatitis C patients on standard bi-therapy", Falk Symposium 186 – 5-6 Oct. 2012. Challenges of liver cirrhosis and tumors: prevent it, treat it, menages, consequences – poster presentation
2. Nikolova N, Antonov K, Jelev D, Ivanova A, Mateva L, Krastev Z, "Natural course of HCV RNA. The paradigm of 5 logs? Falk Symposium 186 – 5-6 Oct. 2012. Challenges of liver cirrhosis and tumors: prevent it, treat it, menages, consequences – poster presentation

3. Nikolova N, Jelev D, Antonov K, Nucleoside analogues and their adverse events, 23<sup>rd</sup> Annual assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB) in Varna, 9-12 May 2013, oral presentation
4. Nikolova N, Antonov K, Jelev D, Mateva L, Krastev Z, The cytokine IP-10 In chronic HBV and HCV infection, 23<sup>rd</sup> Annual assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB) in Varna, 9-12 May 2013, oral presentation
5. Nikolova N, Jelev D, Antonov K, Krastev Z, Inosine pranobex can enhance HBeAg-loss during long-term Tenofovir treatment, EASL Translational Research in Chronic Viral Hepatitis - Bridging Basic Science and Clinical Research (monothematic conference), 29-30. Nov 2013, poster presentation
6. Nikolova N, Jelev D, Antonov K, Krastev Z, Add-on Inosine pranobex can reduce serum HBsAg level in HBeAg-negative NUC responders, Gastro Update Europe 2014, 1<sup>st</sup> European Update Congress in Gastroenterology, 16-17 May 2014, Vienna, poster presentation
7. Nikolova N, Jelev D, Antonov K, Krastev Z, HBsAg level after consecutive add-on peginterferon-alfa 2a and inosine pranobex in long-term responder to lamivudine, Gastro Update Europe 2014, 1<sup>st</sup> European Update Congress in Gastroenterology, 16-17 May 2014, Vienna, poster presentation
8. Nikolova N, Jelev D, Antonov K, Mateva L, Krastev Z, Dynamic of qHBsAg during standard therapy with Peg-IFN alfa 2a in Bulgarian patients with chronic hepatitis B, 25<sup>th</sup> Jubilee Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB) in Varna, 14-17 May 2015, oral presentation
9. Nikolova N, Antonov K, Jelev D, Mateva L, Krastev Z, IL28B genotype in Bulgarian patients with chronic HCV infection and the response to

standard bitherapy, 25<sup>th</sup> Jubilee Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB) in Varna, 14-17 May 2015, oral presentation

„Всяка сила е постигната с търпение и време.”

Балзак



