

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Sindromul metabolic și fibroza hepatică în infecția cronică virală C- evoluție  
naturală și sub tratament**

Doctorand: **Dana Crișan**

Conducător de doctorat: **prof. dr. Mircea Grigorescu**

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>14</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>17</b>
<b>1. Sindromul metabolic în hepatita cronică virală C</b>	<b>19</b>
1.1 Introducere	19
1.2 Parametrii biologici și morfologici ai componentei metabolice a infecției virale C	19
1.4 Steatoza hepatică în infecția virală C	22
1.5 Profilul adipocitokinelor în hepatita cronică C	23
<b>2. Explorarea morfologică și neinvazivă serologică în infecția virală C</b>	<b>25</b>
2.1 Biopsia hepatică	25
2.2 Mijloace neinvazive de evaluare a fibrozei hepatice	27
2.2.1. Markerii serici indirecti	27
2.2.2 Markerii serici directi	28
2.2.3 Markerii compoziți	29
<b>3. Evoluția în dinamică a fibrozei în hepatita cronică virală C</b>	<b>31</b>
3.1 Metodele neinvazive în evaluarea fibrozei la start	31
3.2 Evaluarea în dinamică a fibrozei prin teste serologice	31
3.3 Evaluarea în dinamică a fibrozei prin ET	32
<b>4. Evoluția în dinamică a sindromului metabolic și a insulinorezistenței în hepatita cronică virală C</b>	<b>34</b>
4.1 HVC, insulinorezistența și fibroza	34
4.2 Rezistența la interferon indusa de IR	34
4.3 Efectul ameliorării IR asupra RVS	35
4.4 Efectul RVS asupra IR și steatozei	36
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>38</b>
<b>1. Introducere: ipoteza de lucru și obiective</b>	<b>39</b>
<b>2. Metodologie generală</b>	<b>44</b>
2.1 Pacienți	44
2.2 Metoda	44
2.2.1 Date antropometrice	44
2.2.2 Investigații de laborator	44
2.2.3 Evaluarea sindromului metabolic	45
2.2.4 Explorări virusologice	45
2.2.5 Evaluarea morfopatologică	45
2.2.6 Măsurarea rigidității hepatice	46
2.2.7 Analiza statistică	46
<b>3. Componenta metabolică a infecției virale C- parametrii metabolici, morfologici și virusologici</b>	<b>48</b>
3.1 Ipoteza de lucru	48
3.2 Pacienți și metode	48
3.3 Rezultate	49

3.3.1	Caracteristicile pacienților	49
3.3.2	Rezistență la insulină și corelația cu alte variabile	52
3.3.3	Profilul adipocitokinic	53
3.3.4	Analiza factorilor asociați cu modificările morfologice în HVC	56
3.3.5	Parametrii virusologici	60
3.4	Discuții	60
3.5	Concluzii	63
<b>4.</b>	<b>Analiza comparativă a sindromului metabolic în ficatul gras nonalcoolic și hepatita cronică virală C</b>	<b>64</b>
4.1	Ipoteza de lucru	64
4.2	Material și metodă	64
4.3	Rezultate	65
4.4	Discuții	68
4.5	Concluzii	71
<b>5.</b>	<b>Două sau mai multe combinații sincrone de teste neinvazive pentru creșterea acurateții detectării fibrozei hepatice în hepatita cronică C. Rezultele unei cohorte de 446 pacienți</b>	<b>72</b>
5.1	Ipoteza de lucru	72
5.2	Pacienți și metodă	73
5.3	Rezultate	74
5.4	Discuții	79
5.5	Concluzii	82
<b>6.</b>	<b>Urmărirea prospectivă neinvazivă a fibrozei hepatice în hepatita cronică C</b>	<b>83</b>
6.1	Ipoteza de lucru	83
6.2	Pacienți și metode	84
6.3	Rezultate	86
6.4	Discuții	92
6.5.	Concluzii	94
<b>7.</b>	<b>Urmărirea prospectivă a sindromului metabolic și insulinorezistenței în HVC</b>	<b>96</b>
7.1	Ipoteza de lucru	96
7.2	Metoda	96
7.3	Rezultate	98
7.4	Discuții	102
7.5	Concluzii	105
<b>8.</b>	<b>Concluzii generale (sinteză)</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>108</b>
<b>REFERINȚE</b>		<b>110</b>

**Cuvinte cheie:** sindrom metabolic, fibroza hepatica, markeri neinvazivi, hepatita cronică C

Hepatita cronică virală C (HVC) este o problemă de sănătate publică, atât la nivel național, cât și global. Conotațiile patologice complexe evidențiate până în prezent fac din infecția cronică virală C o boală care nu trebuie limitată la ficat, ci trebuie privită și ca o boală metabolică, implicând: rezistența la insulină, prevalența înaltă a steatozei, modificări ale metabolismului lipidic, diabet zaharat și complicații cardio-vasculare.

Toate aceste aspecte sugerează asocierea strânsă între HVC și sindromul metabolic (SM), având ca factor central insulinorezistența (IR). În HVC există o relație complexă între IR și steatoza hepatică, aceasta favorizând la rândul ei progresia fibrozei și influențând rata răspunsului virusologic susținut (RVS). Cercetarea detaliată a factorilor care contribuie la rata suboptimală de RVS și potențiala lor modificare sub tratament sunt încă teme de studiu.

Profilul adipocitokinic joacă un rol distinct alături de IR în patogeneza HVC. Citokinele produse de țesutul adipos au un rol major în modularea răspunsului inflamator și sensibilității la insulina și contribuie la dezvoltarea anomaliilor metabolice. Adiponectina și leptina sunt reprezentantele cele mai pregnante ale clasei adipocitokinelor și au fost alese în cercetarea de față pentru studiul implicării profilului adipocitokinic în patogeneza HVC. Astfel, evaluarea componentei metabolice a infecției virale C prin studiul complex al parametrilor metabolici, morfologici și virusologici devine un deziderat important pentru cunoașterea și tratarea bolii.

Teoria conform căreia patogeneza steatozei în HVC ar fi mai bine înțeleasă prin comparație cu patogeneza FGNA a deschis calea unei noi linii de cercetare. În acest context s-a elaborat ipoteza existenței mai multor tipuri de steatoză hepatică în funcție de etiologie și nu toate sunt asociate cu rezistența la insulină. Compararea trăsăturilor metabolice ale HVC și FGNA au pus în lumină aspecte patogenetice importante ale componentei metabolice induse viral.

Sindromul metabolic, IR și steatohepatita sunt implicate în evoluția hepatitei cronice virale C, favorizând progresia fibrozei. Pe de altă parte, istoria naturală a HVC implică aspectul progresiv al fibrozei cu evoluție posibilă spre ciroză, cu toate complicațiile acesteia. În acest context, evaluarea fibrozei în hepatopatiile cronice este utilă nu doar în stadializarea bolii și estimarea prognosticului, ci și în stabilirea momentului optim pentru strategiile de tratament.

Până de dată recentă, fibroza a fost evaluată doar prin puncție biopsie hepatică (PBH). Dezavantajul invazivității și limitările metodei sunt sursa cercetărilor pentru identificarea unor teste alternative, neinvazive pentru evaluarea fibrozei, grupate deja în scoruri serologice sau metode imagistice (elastografia tranzitorie). Numărul scorurilor biologice pentru evaluarea fibrozei hepatice a crescut semnificativ în ultima decadă și încep să fie incluse în practica clinică curentă.

Majoritatea testelor au fost validate și recomandate ca evaluare inițială a fibrozei la pacienții infectați cu virus hepatitic C, fără alte comorbidități, care nu fuseseră tratați în prealabil. După cunoștința noastră, există puține studii asupra evaluării prospective în dinamică a fibrozei hepatice prin mijloace neinvazive la pacienții tratați sau în evoluție naturală. Dacă la momentul actual, diferite metode neinvazive și-au demonstrat avantajele în evaluarea fibrozei hepatice la startul tratamentului, considerăm că utilitatea lor poate fi testată și în urmărirea prospectivă a acestor pacienți.

Ca ipoteza de lucru, această teză de doctorat a urmărit pe parcursul a cinci studii distincte evaluarea componentei metabolice la pacienții cu HVC, implicarea acesteia în progresia bolii și răspunsul la tratament. În cadrul sindromului metabolic, insulinorezistența și steatoza au fost incriminate în progresia fibrozei hepatice. În

acest context, două din capitolele tezei au avut ca scop evaluarea fibrozei în HVC prin metode neinvazive și urmărirea comportamentului acesteia pe parcursul tratamentului, în funcție de RVS. Astfel, dintre studiile cuprinse în această teză, trei au fost de tip transversal, dar cu înrolare prospectivă consecutivă a pacienților cu HVC, iar două au fost de tip longitudinal, de urmărire în dinamică a evoluției pacienților.

Obiectivele care au stat la baza acestei cercetări au fost:

- evaluarea componentei metabolice a infecției virale C prin studiul complex al parametrilor metabolici, morfologici și virusologici
- studiul comparativ al variabilelor SM la pacienții cu HVC și FGNA, având în vedere rolul important al SM în generarea steatozei hepatice și, de asemenea, istoria naturală a FGNA
- evaluarea performanței diagnostice și a fiabilității unor metode serologice și imagistice neinvazive în estimarea fibrozei semnificative și severe în hepatita cronică C și posibilitatea creșterii acurateții diagnostice prin combinarea diferitelor scoruri sau prin adăugarea unei metode imagistice la rezultatele biomarkerilor care evaluează severitatea fibrozei hepatice.
- urmărirea în dinamică a comportamentului fibrozei hepatice la un grup de pacienți cu infecție virală C, tratați sau în evoluție naturală, prin utilizarea testelor biologice neinvazive și a ET.
- evaluarea influenței IR, factorilor SM și steatozei hepatice asupra RVS și, de asemenea, comportamentul acestora în dinamică, la pacienții tratați (cu sau fără RVS) comparativ cu pacienții urmăriți în evoluție naturală.

Rezultatele studiului întâi care a urmărit analiza prevalenței și implicării componentelor sindromului metabolic în HVC, au aratat ca SM și IR au prevalență crescută în infecția cronică virală C. Rezistența la insulină, exprimată în cercetarea de față prin HOMA-IR, se corelează semnificativ cu IMC, activitatea necroinflamatorie și gradul steatozei hepatice. Steatoza hepatică este prezentă la 58,1% dintre pacienții cu hepatită cronică C, dar steatoză semnificativă (S3-4) se întâlnește doar în 12,8% dintre cazuri. Profilul adipocitokinelor ar putea reprezenta veriga lipsă dintre infecția virală C și factorii metabolici ai gazdei în generarea modificărilor biologice și morfologice constatate în hepatita cronică.

Al doilea studiu și-a propus analiza comparativă a variabilelor SM la pacienții cu HVC și FGNA, având în vedere rolul important al SM în generarea steatozei hepatice. Rezultatele vin în sprijinul concluziei larg acceptate ca hepatita cronică virală C este o boală sistemică, afectarea hepatică fiind însoțită și de alte modificări patologice, inclusiv trăsături ale SM. Compararea trăsăturilor metabolice între HVC și FGNA a evidențiat diferențe între cele două afecțiuni, perturbările metabolice având patogeneza diferită. Factorul major care le unește este rezistența la insulină. Trăsăturile SM sunt semnificativ mai frecvente în FGNA, sugerând mai probabil importanța implicării factorilor metabolici ai gazdei în apariția componentei metabolice în HVC decât determinismul viral, în special în contextul infecției prezumtive cu VHC genotip 1.

Studiul al treilea a avut ca scop evaluarea performanței diagnostice și a fiabilității unor metode serologice și imagistice neinvazive în estimarea fibrozei semnificative și severe în hepatita cronică C (HVC), în comparație cu biopsia hepatică. De asemenea, s-a urmărit posibilitatea creșterii acurateții diagnostice (AD) prin combinarea diferitelor scoruri sau prin adăugarea unei metode imagistice la biomarkerii care evaluează severitatea fibrozei hepatice. Analiza performanței diagnostice a ET și a mijloacelor serologice utilizate pentru evaluarea fibrozei hepatice a relevat faptul că, luate individual, aceste metode oferă rezultate similare, cu mici diferențe între ele; totuși, o combinație sincronă a unor teste serice simple și necostisitoare care include determinări biochimice de rutină alături de Fibrometer, FibroTest sau ET duce la creșterea performanței diagnostice a testelor neinvazive. Prin creșterea AD, acest tip de combinație ar putea scădea necesitatea efectuării PBH, dar sunt necesare studii aprofundate pentru a stabili combinațiile optime din punctul de vedere al ratei cost-beneficiu. Deși combinația a trei teste a determinat ameliorarea AD, aceasta abordare nu este justificată prin prisma raportului cost/eficiență.

În studiul al patrulea, s-a urmărit evoluția fibrozei hepatice în dinamica prin metode neinvazive de tip serologic sau imagistic (ET), la pacienții cu HVC, în evoluție naturală sau sub terapie de tip *standard of care* (SOC). Atât ET cât și biomarkerii serologici par să fie metode acurate de evaluare a fibrozei la startul tratamentului și în dinamică pentru pacienții cu HVC, având un comportament aproape similar, cu disconcordanțe nesemnificative între ele. Fibroza hepatică, evaluată prin metode neinvazive, are tendință la scădere la pacienții tratați, în special la cei din grupul RVS. Inflamația, reflectată de nivelul transaminazelor, nu pare să influențeze semnificativ ameliorarea fibrozei. Pacienții cirofici pot beneficia de urmărirea neinvazivă a fibrozei hepatice prin ET și scorurile biologice folosite pentru predicția cirozei, pacienții tratați beneficiind de avantajul regresiei fibrozei. Rămâne un subiect controversat dacă ameliorarea fibrozei survine la întregul grup de pacienți tratați sau depinde într-adevăr de obținerea RVS. Sunt necesare studii aprofundate care să includă combinarea acestor scoruri cu ET sau folosirea panelurilor serologice complexe care conțin biomarkeri direcți pentru a crește performanța diagnostică a acestor metode.

Studiul al cincilea, ultimul inclus în această teză, a avut ca obiectiv evaluarea influenței IR, factorilor SM și steatozei hepatice asupra RVS și, de asemenea, comportamentului acestora în dinamică, la pacienții tratați (cu sau fără RVS) comparativ cu pacienții urmăriti în evoluție naturală. Factorii metabolici implicați în patogeneza HVC, având insulinorezistența ca element central, au demonstrat o influență negativă asupra progresiei bolii și ratei RVS. Pe lotul nostru de studiu, steatoza hepatică nu a influențat negativ RVS, dar valoarea crescută a adiponektinei a favorizat răspunsul la tratament. O observație importantă a fost influența profilului lipidic asupra ratei de răspuns virusologic. Colesterolemia crescută la start favorizează rata RVS, confirmând implicarea fracțiunilor colesterolului în ciclul de viață al VHC. Urmărirea în dinamica a componentei metabolice a evidențiat scăderea semnificativă a insulinorezistenței în lotul de pacienți la care s-a obținut clearance-ul viral, susținând implicarea virusului în lanțul metabolic al acestei entități patologice.

### **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Această cercetare a urmărit aspecte legate de implicarea sindromului metabolic în hepatita cronică virală C și, de asemenea, importanța metodelor neinvazive în evaluarea fibrozei hepatice.

Asupra componentei metabolice a infecției cronice virale C s-au făcut studii multiple în ultima decadă, dar influența factorilor metabolici asupra ratei de răspuns virusologic nu este deplin elucidată. Studiul care a evidențiat impactul sindromului metabolic, insulinorezistenței și profilului adipocitokinic asupra RVS este de actualitate. În special evaluarea în dinamica a componentei metabolice este valoroasă prin evidențierea insulinorezistenței ca factor central al acestei intrinseci patologice. Urmărirea prospectivă a sindromului metabolic în HVC nu a dovedit ameliorarea semnificativă a acestuia la pacienții tratați, dar la pacienții care au obținut RVS, s-a obținut ameliorarea insulinorezistenței, în acord cu rezultatele raportate recent de cercetătorii în domeniu. Importanța acestor rezultate rezidă în continuarea cercetării impactului terapiei insulinosensibilizante asupra ratei de RVS. După cunoștința noastră, evaluarea în dinamică a componentei metabolice în HCV în funcție de răspunsul virusologic este pentru prima dată raportată în literatura autohtonă.

Din punct de vedere al importanței evaluării fibrozei în HVC, studiul se încadrează în tendința actuală de validare a unor metode neinvazive serologice sau imagistice a căror valoare diagnostică să le recomande pentru înlocuirea standardului actual – biopsia hepatică.

În ceea ce privește metodele neinvazive, rezultatele lucrării de față, efectuată pe o cohortă de 446 de subiecți, au confirmat acuratețea diagnostică bună obținută prin combinarea a două scoruri serologice sau prin asocierea elastografiei tranzitorii cu un scor biologic. Combinarea a trei metode neinvazive ameliorează

nesemnificativ acuratețea diagnostică, această asocieră nefiind justificată în condițiile creșterii suplimentare a costului.

În acord cu datele existente în literatură, studiul de urmărire în dinamică a fibrozei hepatice a confirmat scăderea fibrozei la pacienții tratați, în special în cadrul grupului care au obținut RVS, utilizând ca metode de evaluare mijloacele neinvazive, serologice și imagistice. Unul dintre scoruri a inclus și markeri direcți de evaluare a fibrozei pentru creșterea acurateții diagnostice. Prin evaluarea comportamentului grupului de pacienți care au obținut răspuns biologic, studiul de față a infirmat influența inflamației, evaluată prin prezența sindromului de hepatocitoliză, asupra scorurilor serologice și asupra elastografiei. O concluzie importantă a reieșit și din studiul prospectiv al pacienților cirofici, care a dovedit ameliorarea fibrozei și în acest grup. Evaluarea neinvazivă a fibrozei hepatice în dinamică în funcție de tratament și de răspunsul virusologic este, după cunoștința noastră, pentru prima dată raportată în literatura autohtonă.

Validarea prospectivă a scorurilor biologice complexe, în special a celor bazate pe markeri direcți de evaluare a fibrozei și modificarea factorilor metabolici care influențează RVS sunt principalele noastre preocupări pentru viitorul apropiat.

PhD thesis abstract

**Metabolic syndrome and liver fibrosis in chronic hepatitis C – outcome with and without treatment**

PhD student: **Dana Crisan**

Mentor: **Prof. Mircea Grigorescu, MD, PhD**

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>14</b>
<b>CURRENT STATE OF THE ART</b>	<b>17</b>
<b>1. The metabolic syndrome in chronic hepatitis C</b>	<b>19</b>
1.1 Introduction	19
1.2 The biological and morphological parameters of the metabolic component in hepatitis C infection	19
1.4 Liver steatosis in hepatitis C infection	22
1.5 The adipocytokine profile in chronic hepatitis C	23
<b>2. Morphological and serological noninvasive exploration in hepatitis C infection</b>	<b>25</b>
2.1 Liver biopsy	25
2.2 Noninvasive methods for liver fibrosis assessment	27
2.2.1. Indirect serum markers	27
2.2.2 Direct serum markers	28
2.2.3 Combined markers	29
<b>3. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C</b>	<b>31</b>
3.1 Noninvasive methods for fibrosis assessment at treatment initiation	31
3.2 Fibrosis assessment during follow up using serological tests	31
3.3 Fibrosis assessment during follow up using TE	32
<b>4. Evolution of the metabolic syndrome and insulin resistance in chronic hepatitis C</b>	<b>34</b>
4.1 HCV, insulin resistance and fibrosis	34
4.2 IR induced interferon resistance	34
4.3 The effect of IR improvement in SVR	35
4.4 The effect of SVR on IR and steatosis	36
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>38</b>
<b>1. Introduction: work hypothesis and objectives</b>	<b>44</b>
<b>2. General methodology</b>	<b>44</b>
2.1 Patients	44
2.2 Method	44
2.2.1 Anthropometric data	44
2.2.2 Laboratory tests	44
2.2.3 Assessing the metabolic syndrome	45
2.2.4 Virological explorations	45
2.2.5 Morphopathological assessment	45
2.2.6 Liver stiffness measurement	46
2.2.7 Statistical analysis	46
<b>3. The metabolic component of hepatitis C infection - metabolic, morphological and virologic parameters</b>	<b>48</b>
3.1 Work hypothesis	48
3.2 Patients and methods	48
3.3 Results	49

3.3.1 Patient characteristics	49
3.3.2 Insulin resistance and correlation with other variables	52
3.3.3 Adipocytokine profile	53
3.3.4 Analysis of factors associated with CHC morphological changes	56
3.3.5 Virological parameters	60
3.4 Discussions	60
3.5 Conclusions	63
<b>4. Comparative analysis of the metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C</b>	<b>64</b>
4.1 Work hypothesis	64
4.2 Material and method	64
4.3 Results	65
4.4 Discussions	68
4.5 Conclusion	71
<b>5. Two or more synchronous combinations of noninvasive tests for increased accuracy in detecting liver fibrosis in chronic hepatitis C. Results of a cohort of 446 patients</b>	<b>72</b>
5.1 Work hypothesis	72
5.2 Patients and method	73
5.3 Results	74
5.4 Discussions	79
5.5 Conclusion	82
<b>6. Prospective noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis C</b>	<b>83</b>
6.1 Work hypothesis	83
6.2 Patients and method	84
6.3 Results	86
6.4 Discussions	92
6.5. Conclusion	94
<b>7. Prospective follow up of the metabolic syndrome and insulin resistance in CHC</b>	<b>96</b>
7.1 Work hypothesis	96
7.2 Method	96
7.3 Results	98
7.4 Discussions	102
7.5 Conclusion	105
<b>8. General conclusions (synthesis)</b>	<b>106</b>
<b>9. Originality and inovative contribution</b>	<b>108</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>110</b>

**Key words:** metabolic syndrome, liver fibrosis, noninvasive markers, viral C hepatitis

Chronic hepatitis C (CHC) is at the moment an important public health issue, both in our country and worldwide. Because of the complex mechanisms involved in chronic hepatitis C infection identified so far, we should consider this condition as not only confined to the liver, but as a metabolic disease, involving: insulin resistance, high steatosis prevalence, alterations in the lipid metabolism, diabetes mellitus and cardiovascular complications.

All these elements plead for an intimate connection between CHC and the metabolic syndrome (MS), both having insulin resistance (IR) as the focal point. A complex relationship exists between IR and liver steatosis during CHC course; steatosis is further involved in promoting fibrosis progression and influences the rate of sustained virological response (SVR). The detailed research of the factors contributing to a suboptimal SVR rate and their potential modification under treatment are still subjects of study.

The adipocytokine profile plays a distinct part alongside IR in the CHC pathogenesis. The cytokines produced in the adipose tissue have a major role in the modulation of inflammatory processes and insulin sensitivity and contribute to the development of metabolic anomalies. Adiponectin and leptin are the most prominent representatives of the adipocytokine class and were chosen in this research for the study of the involvement of the adipocytokine profile in CHC pathogenesis. Therefore, assessing the metabolic component of the hepatitis C infection through the complex study of the metabolic, morphological and virological components becomes an important challenge in the knowledge and treatment of disease.

The theory claiming that the pathogenesis of steatosis in CHC would be better understood by comparing it with NAFLD pathogenesis has opened the way to new lines of research. In this respect, a hypothesis was formed on the existence of several types of liver steatosis depending on etiology, not all associated with insulin resistance. Comparing the metabolic features of CHC and NAFLD has brought to light important pathogenic aspects of the viral-induced metabolic component.

The metabolic syndrome, IR and steatohepatitis are involved in the progression of chronic hepatitis C, promoting fibrosis progression. On the other hand, the natural course of CHC implies the progression of fibrosis with possible evolution towards cirrhosis, with all its complications. In this context, fibrosis assessment in chronic liver diseases is useful not only in disease staging and prognosis estimation, but also in establishing the optimal moment for treatment strategies.

Until recently, fibrosis has been assessed only through liver biopsy (LB). Its invasiveness and limitations are the rationale for accelerating the research into alternative, noninvasive methods for fibrosis assessment, (which have already been combined into serological scoring systems), and imaging methods (such as transient elastography). The number of biological scoring systems for the estimation of liver fibrosis has significantly increased in the last decade and they begin to be included into current clinical practice.

Most of the tests have already been validated and recommended for the initial evaluation of fibrosis in patients with hepatitis C virus infection having no other comorbidities and without prior treatment. To our knowledge, there are few studies on the prospective assessment of liver fibrosis using noninvasive methods in patients treated or followed-up without treatment. Since, at present, various noninvasive methods have proven their advantages in the assessment of fibrosis at treatment initiation, our view was that their utility could be tested in the prospective follow up of these patients as well.

As a working hypothesis, for this PhD thesis we have monitored through five distinctive studies the assessment of the metabolic component, its implication in disease progression and treatment response in CHC patients. Of the metabolic syndrome, insulin resistance and steatosis have been incriminated in the progression of liver fibrosis. In this context, two chapters of the thesis aimed at assessing fibrosis in CHC using noninvasive methods and monitoring the changes in fibrosis during treatment, according to SVR. For this purpose, three of the studies detailed in this thesis have been transversal, but with prospective consecutive inclusion of CHC patients and two have been longitudinal, for the dynamic follow up of patients.

The objectives of this research were:

- the assessment of the metabolic component of hepatitis C infection through the complex study of metabolic, morphological and virological parameters
- the comparative study of MS variables in patients with CHC and NAFLD, taking into account the important part played by the MS in inducing liver steatosis and also in the natural history of NAFLD
- the assessment of the diagnostic performance and reliability of serological and imaging noninvasive methods in estimating significant and severe fibrosis in chronic hepatitis C and the possibility to increase diagnostic accuracy by combining the various scoring systems or by adding an imaging method to the biomarker results assessing the severity of liver fibrosis
- the dynamic follow up of the changes in liver fibrosis in a group of patients with hepatitis C infection, with or without treatment, using noninvasive biological tests and TE
- the estimation of the influence of IR, MS factors and liver steatosis on SVR and also their changes in time in treated patients (with or without SVR) as compared to patients followed during the natural course of disease.

The results of the first study, aiming to analyze the prevalence and involvement of MS components in CHC, showed that the MS and IR have a high prevalence in chronic hepatitis C. Insulin resistance, expressed in the present research through the HOMA-IR, correlated significantly with the BMI, necroinflammatory activity and steatosis grade. Liver steatosis was found in 58.1% of CHC patients, but significant steatosis (S3-4) was only found in 12.8% of cases. The adipocytokine profile could represent the missing link between hepatitis C infection and the metabolic host factors in inducing the biological and morphological alterations found in chronic hepatitis.

In the second study we wanted to perform a comparative analysis of MS variables in patients with CHC and NAFLD, considering the important part played by the MS in inducing liver steatosis. Our results confirmed the generally accepted conclusion that chronic hepatitis C is a systemic condition, with other pathological alterations beside the hepatic involvement, including features belonging to the MS. Comparing the metabolic features of CHC and NAFLD we found certain differences between the two conditions, due to different pathogenesis. The major common factor is insulin resistance. The MS features are significantly more frequent in NAFLD, probably suggesting the importance of host metabolic factors in the occurrence of the metabolic component during CHC, rather than viral determinants, especially in the presumed infection with HCV genotype 1.

The third study aimed at assessing the diagnostic performance and reliability of certain noninvasive serological and imaging techniques in estimating significant and severe fibrosis in chronic hepatitis C (CHC), by comparison with liver biopsy (LB). In addition, we attempted to increase the diagnostic accuracy (DA) by combining different scoring systems or by adding an imaging technique to the biomarkers evaluating the severity of liver fibrosis. When analyzing the diagnostic performance of TE and of serological markers in the assessment of liver fibrosis, we found similar results of all these methods when used individually, with slight differences; however, a synchronous combination of simple and inexpensive serological tests, including routine biochemical determinations, and Fibrometer, FibroTest or TE provided an increase in the diagnostic performance of

noninvasive tests. By increasing DA, this type of combination may decrease the need for LB; further studies are, however, necessary, to establish the optimal combination from a cost-benefit point of view. Although the combination of three tests has led to an improvement in DA, this approach cannot be justified by the cost-benefit ratio.

In the fourth study, we monitored the progression of liver fibrosis using noninvasive serological or imaging methods (TE) in CHC patients, either in the natural course of disease or with *standard of care* (SOC) therapy. Both TE and the serological biomarkers appear to be accurate assessment methods of fibrosis in CHC patients, at the onset of treatment as well as during follow up; their values changed in time in a similar way, with only slight differences. Liver fibrosis, as assessed by noninvasive methods, tends to decrease in treated patients, especially in the SVR group. Inflammation, reflected in the transaminase level, does not appear to influence significantly the improvement of fibrosis. Cirrhotic patients could benefit from the noninvasive assessment of liver fibrosis through TE and the biological scoring systems used for cirrhosis prediction; a regression of fibrosis has been found in treated patients. Whether the improvement of fibrosis occurs in the entire group of treated patients or whether it depends indeed of SVR remains a controversial subject. Further studies, including combinations of these scores with TE or using complex serological panels that contain direct biomarkers, are required to improve the diagnostic performance of these methods.

The fifth study, the last of the thesis, aimed at assessing the influence of IR, MS factors and liver steatosis on SVR and, at the same time, their behavior during follow-up, in treated patients (with or without SVR) compared with patients followed up during the natural course of disease. The metabolic factors involved in CHC pathogenesis, with insulin resistance as the main feature, have been proven to exert a negative influence on disease progression and SVR rate. In our study group, liver steatosis had no negative influence on SVR but the high adiponectin levels promoted treatment response. An important observation we made involved the influence of lipid profile on the virological response rate. High cholesterol levels at onset improve the SVR rate, confirming the involvement of cholesterol fractions in the HCV life cycle. When monitoring the progression of the metabolic component, we found a significant decrease in insulin resistance in the patients having achieved viral clearance, supporting the involvement of the virus in the metabolic processes of this condition.

## **Originality and innovative contribution of the thesis**

This research was focused on aspects related to the involvement of the metabolic syndrome in chronic hepatitis C and, at the same time, to the importance of noninvasive methods in the assessment of liver fibrosis.

Several studies have been performed on the metabolic component of chronic hepatitis C during the past ten years, but the influence of metabolic factors in the virological response rate has not been fully clarified. Our study, expanding on the impact of the metabolic syndrome, insulin resistance and adipocytokine profile in SVR, has proven its actuality. The dynamic assessment of the metabolic component is especially valuable by pinpointing insulin resistance as the central element of these pathogenic pathways. The prospective follow up of the metabolic syndrome in CHC could not prove its significant improvement in treated patients; however, in patients having achieved SVR, we found diminished insulin resistance, in accordance with the latest reported results of researchers in the field. The importance of these results resides in boosting the research on the impact of insulin-sensitizing medication on the SVR rate. To our knowledge, the dynamic assessment of the metabolic component in CHC dependent on virological response is reported now for the first time in the national literature.

As far as the importance of fibrosis assessment in CHC is concerned, this study attempted to add to the present efforts made for the validation of certain noninvasive serological or imaging methods in order to recommend them for the replacement of the present standard – liver biopsy.

In what concerns the noninvasive methods, the results of the present research, performed on a group of 446 subjects, have confirmed the good diagnostic accuracy obtained by combining two serological scores or by associating transient elastography with a biological score. Combining three noninvasive methods provides an insignificant improvement of diagnostic accuracy, which does not justify the use of this association because of additional increase in costs.

In agreement to the literature data, the study on the dynamic follow up of liver fibrosis has confirmed the decrease in fibrosis in treated patients, especially in the SVR group; the study has used the noninvasive, both serological and imaging, methods. One of the scores has also included direct markers of fibrosis assessment in order to increase diagnostic accuracy. By evaluating the changes in patients having achieved a biological response, the present study has invalidated the influence of inflammation (reflected in the transaminase levels) on the serological scoring systems and on elastography. An important conclusion has also resulted from the prospective study on cirrhotic patients, having proven improvement of fibrosis in this group as well. The noninvasive assessment of liver fibrosis in progression depending on treatment and virological response is, to our knowledge, the first reported in the national literature.

The prospective validation of complex biological scores, especially of those based on direct markers for the assessment of fibrosis, and the changes in the metabolic factors influencing the SVR are our main concerns for the near future.