

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”,
BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

FACULTATEA DE MEDICINA



*Impactul tratamentului Interferon-free in hepatita
virală cu virus C. Perspective biochimice, imagistice și
epigenetice.*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. ILIESCU ELENA LAURA

Student-doctorand:

ISAC TEODORA

2022

CUPRINS

INTRODUCERE	10
PARTEA GENERALĂ	14
1. Epidemiologia infecției cu virus C.....	14
2. Etiologie.....	18
3. Mod de transmitere.....	20
4. Fiziopatologia infecției cu virusul hepatic C- circuitul virusului în organismul uman.....	21
5. Manifestări clinice ale infecției cu virusul hepatic C.....	22
6. Aspecte morfopatologice.....	26
7. Diagnostic pozitiv. Diagnostic serologic.....	29
8. Aspecte imagistice ale hepatopatiilor cronice.....	31
8.1 Măsurarea gradului de fibroză prin elastografie FibroScan.....	33
8.2 Ecografia hepatică în hepatita cu virus C.....	36
9. Diagnosticul diferențial al infecției cu virus C.....	37
10. Complicațiile infecției cu virus C.....	38
11. Prognosticul și evoluția hepatitei VHC.....	45
12. Principii de tratament în hepatita cu virus C. Tratamentul cu antivirale noi Interferon Free.....	46
12.1 Tratamentul hepatitei cronice VHC.....	46
12.2 Tratamentul hepatitei acute VHC.....	56
12.3 Tratamentul cirozei și complicațiilor cirozei.....	57
13. Modificări epigenetice în hepatita cronică cu virus C.....	59
PARTEA SPECIALĂ	61
14. Ipoteze de lucru și obiective generale ale studiului.....	61
15. Metodologia generală a cercetării științifice.....	63
15.1. Criterii de includere și excludere. Designul loturilor de studiu.....	63
15.2. Etapele cercetării științifice.....	65
15.2.1 Analiza dinamicii AFP în hepatita virală C.....	65
15.2.2 Analiza biomarkerilor epigenetici în VHC în absența HCC.....	66
15.3. Analiza statistică a datelor.....	67
16. Rezultate.....	68
16.1. Analiza descriptivă a loturilor studiate.....	68

16.2. Studiul AFP.....	75
16.3. Biomarkeri epigenetici în HVC fără HCC.....	88
17. Discuții.....	128
17.1 Studiul dinamicii AFP în hepatita VHC în absența HCC.....	128
17.2 Studiu comparativ și corelativ de analiză și identificare al unor biomarkeri epigenetici în hepatita virală C.....	131
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....	135
BIBLIOGRAFIE.....	138
ANEXE.....	152

LISTĂ CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ARTICOLE IN EXTENSO

1. **Isac T**, Isac S, Rababoc R, Cotorogea M and Iliescu L: Epigenetics in inflammatory liver diseases: A clinical perspective (Review). *Exp Ther Med* 23: 366, 2022
<https://doi.org/10.3892/etm.2022.11293>
2. **Isac T**, Isac S, Ioanitescu S, Mihaly E, Tanasescu M, Balan DG, Tulin A and Iliescu L: Dynamics of serum α -fetoprotein in viral hepatitis C without hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 22: 749, 2021 <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10181>
3. **Isac T**, Gabriela Droc, Artsiom Klimko, Mihail Cotorogea-Simion, Maria Dobre, Elena Milanesi, Natalia Cucu, Andra-Elena Balcangiu-Stroescu, Laura Iliescu, Sebastian, Isac: Epigenetic modulation in viral hepatitis C infected patients after successful therapy. *BRIAC* 13; 2022 <https://doi.org/10.33263/BRIAC13X.000>
4. Guler-Margaritis S, Mercan-Stanciu A, Toma L, Rusie D, **Isac T**, Dodot M, Zgura A, Bacalbasa N, Haineala B, Badiu DC, Serban D, Iliescu EL. COVID-19 Mid-term Impact on Hepatocellular Carcinoma in Patients With Hepatitis C Chronic Infection. *In Vivo*. 2021 Nov-Dec;35(6):3377-3383. doi: 10.21873/invivo.12636. PMID: 34697172; PMCID: PMC8627777.
5. Toma L, Dodot M, Zgura A, Bacalbasa N, Silaghi A, Simu R, **Isac T**, Mercan-Stanciu A. Calprotectin in viral systemic infections-COVID-19 versus hepatitis C virus. *Clin Exp Med*. 2021 Jul 12:1-7. doi: 10.1007/s10238-021-00743-7. Epub ahead of print. PMID: 34254197; PMCID: PMC8274470.
6. Iliescu L, Toma L, Mercan-Stanciu A, Grumeza M, Dodot M, **Isac T**, Ioanitescu S. Budd-Chiari syndrome - various etiologies and imagistic findings. A pictorial review. *Med Ultrason*. 2019 Aug 31;21(3):344-348. doi: 10.11152/mu-1921. PMID: 31476215.

PREZENTĂRI ORALE. CONFERINȚE ȘI CONGRESE :

- Congresul Universității de Medicină și Farmacie București, ediția a VIII-a, 2020.
"Infecția VHC și sindromul metabolic " - prezentare orală

- Zilele Institutului Clinic Fundeni, 2018, "Markeri inflamatori în infecția VHC- impactul tratamentului antiviral"- prezentare orală
- Elena L. Iliescu, Mihaela Grumeza, Adriana Mercan, Letitia Toma, Mihai Dodot, **Teodora Isac**. Sa1526 – The Impact of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir with Dasabuvir in Patients with Hcv Associated Cryoglobulinemia- Experience of a Single Center. Gastroenterology, Volume 156, Issue 6, Supplement 1, 2019, Page S-1232, ISSN 0016-5085. doi: 10.1016/S0016-5085(19)40074-7- prezentare orală

INTRODUCERE

Infecția cu virusul hepatic C este o problemă majoră de sănătate la nivel global, având un impact socio-economic important, pe de-o parte asupra calității vieții pacienților, prin complicațiile apărute în contextul bolii, iar pe de altă parte asupra sistemului de sănătate fiind o boală cronic progresivă cu necesitatea spitalizărilor repetate. Prevalența infecției cu VHC este la nivel global de 2,2 %. Hepatita cronică VHC crește riscul apariției complicațiilor, a cirozei hepatice și una din cele mai grave complicații, apariția hepatocarcinomului.

Principalul obiectiv al tezei de doctorat este de a evalua pacienții cu infecție VHC diagnosticați recent, monitorizându-i din punct de vedere biologic dar și imagistic, evidențiind elemente noi în aprecierea progresiei bolii hepatice dar și a răspunsului la tratament. În afară de aceasta teza își propune să descrie o abordare epigenetică a bolii, încercând să evidențieze specii de miRNA ca noi markeri de diagnostic și tratament în monitorizarea modernă a hepatitei VHC.

Prin urmare teza își propune să urmărească dinamica AFP (alfafetoproteinei) la pacienții cu VHC înainte și după tratamentul antiviral cu DAA (agenți antivirali direcți), precum și gradul de fibroză hepatică măsurată prin FibroScan și a incidenței CM (Crioglobulinemiei mixte) în absența glomerulopatiei specifice.

Privind abordarea epigenetică, teza își propune să valideze și să aprecieze în dinamică markeri epigenetici consacrați: miR 7-1, miR 21, miR 122 și miR 885 la pacienții cu RVS (răspuns viral susținut) și să evidențieze modul în care aceștia se corelează cu gradul de citoliză și coleastăz hepatică, cu nivelul inflamației cuantificat prin PCR, VSH și Fibrinogen, cu nivelul viremiei VHC și al gradului de fibroză hepatică.

Metodologia cercetării științifice a inclus următoarele etape:

Studiul s-a efectuat pe 63 de pacienți, dintre acești 36 de pacienți, voluntari sănătoși au constituit lotul control iar 27 de pacienți au constituit lotul de studiu. Cei 27 de pacienți incluși în lotul de studiu au fost evaluați în momentul diagnosticului infecției VHC și la 3 luni distanță.

Prima fază a lucrării doctorale s-a axat pe analiza comparativă a datelor demografice. S-au considerat următorii parametri: vârsta, genul pacientului, statutul social, statutul de fumător, indicele de masă corporală.

În etapa următoare s-au determinat spectrofotometric nivelul plasmatic al albuminei (g/dl), AST (U/l), ALT (U/l), GGT (U/l), FA (U/l), BD (mg/dl), BT (mg/dl), PCR (mg/l), trigliceride

(mg/dl) și colesterol total (mg/dl), Nivelul plasmatic al AFP (ng/ml) și prezența crioglobulinemiei mixte au fost prin chemiluminiscență. Hemograma a fost determinată automat cu ajutorul unui kit dedicat prin citometrie de flux.

Coagulograma a fost realizată din mostre de sânge recoltate pe vacutainere cu EDTA. Au fost determinați următorii parametri: aPTT (sec), PT/INR (sec) și fibrinogenul plasmatic. Pentru aprecierea non-invazivă a fibrozei hepatice s-a folosit tehnologia FibroScan®.

Nivelul replicării virale a fost stabilit cu ajutorul RT-PCR .

Principalele etape au inclus: colectarea ARN total, reverse transcrierea și amplificarea genei de interes, conform protocolului total.

Teza de doctorat este structurată în două părți: o parte generală și o parte specială.

Partea generală a tezei de doctorat include 13 capitole. Primele capitole se referă într-o manieră ilustrativă la infecția cu VHC. Sunt oferite în aceste capitole informații referitoare la epidemiologie, etiologie, mod de transmitere al virusului VHC, fiziopatologia bolii, tablou clinic, diagnostic paraclinic, aspecte imagistice ale hepatopatiilor cronice, stadializare în funcție de gradele de severitate, aspecte histopatologice caracteristice, diagnostic diferențial, complicațiile infecției cu VHC cât și prognosticul și evoluția bolii.

Accentul este pus în capitolul 12 pe principiile de tratament precum și actualități referitoare la noul tratament cu DAA.

Partea specială include patru capitole originale care fac referire la ipoteza de lucru și obiective generale, metodologia generală a cercetării științifice precum și partea experimentală care abordează pe rând cele trei perspective de cercetare luate în discuție: biochimică, imagistică și epigenetică.

Partea experimentală este compusă dintr-o scurtă introducere, materiale și metode specifice, rezultate, discuții și concluzii.

În final sunt structurate concluziile tezei de doctorat. Au fost precizate obiectivele confirmate dar și ipotezele infirmate. Au fost evidențiate contribuțiile proprii dar și rezultatele concordante cu literatura de specialitate.

PARTEA SPECIALĂ

Ipoteze de lucru și obiective generale ale studiului

Lucrarea doctorală de față abordează dimensiunea biochimică, imagistică și epigenetică a pacienților infectați cu VHC precum și evoluția acestora la distanță, secundar terapiei antivirale moderne bazată pe agenți antivirali direcți.

Scopul analizei datelor considerate este de a evidenția o potențială strategie diagnostică și de monitorizare a eficienței terapeutice din perspectiva unor biomarkeri inovativi.

Principalele obiective ale studiului sunt:

- Analiza demografică a coortei incluse în studiu ținând cont de principalele caracteristici antropometrice și sociale: genul pacientului, mediu de proveniență, statutul de fumător/nefumător, BMI, vârsta medie
- Analiza comparativă a nivelului plasmatic al AFP în cazul pacienților cu infecție VHC, în faza acută, replicativă dar și la 3 luni de la diagnostic consecutiv tratamentului antiviral în cazul pacienților cu RVS, în absența HCC
- Analiza comparativă a nivelului fibrozei hepatice evaluată non-invaziv (FibroScan®) în cazul pacienților cu VHC în fază acută, replicativă față de voluntari sănătoși precum și aprecierea variabilității ei ca urmare a răspunsului terapeutic la 3 luni.
- Analiza comparativă a incidenței prezenței CM în cazul pacienților cu VHC în faza acută și secundar terapiei antivirale moderne, în absența glomerulopatiei specifice.
- Identificarea unui model diagnostic bazat pe studiul corelativ al nivelului plasmatic al AFP cu următorii markeri biologici clasici: AST, ALT, GGT, FA, BD, BT, CRP, trigliceride, colesterolul total, albuminemia, parametri coagulogramă, parametri hematologici clasici, nivelul replicării virale în faza acută a hepatitei VHC.
- Validarea unor markeri epigenetici inovativi în infecția cu VHC: miR 7-1, miR 21, miR 122, miR 885
- Aprecierea în dinamică a panelului de markeri epigenetici considerați în cazul pacienților cu RVS secundar tratamentului antiviral direct.
- Analiza corelativă a nivelului plasmatic al miR 7-1 față de biomarkerii clasici considerați: AST, ALT, PCR, replicarea virală, AFP, GGT, FA, VSH, fibrinogenemie, precum și față

de gradul fibrozei hepatice în cazul pacienților infectați cu VHC în fază acută, replicativă, în scop diagnostic și prognostic.

- Analiza variabilității miR 21 față de markerii biochimici considerați: AST, ALT, PCR, replicarea virală, AFP, GGT, FA, VSH, fibrinogenemie, precum și fața de fibroza hepatică în cazul pacienților infectați cu VHC în fază acută, replicativă, în scop diagnostic și prognostic.
- Analiza corelativă a expresiei miR 122 față de nivelul plasmatic al AST, ALT, PCR, replicarea virală, AFP, GGT, FA, VSH, fibrinogen și al fibrozei hepatice în faza replicativă.
- Analiza corelativă a nivelului miR 885 față de biomarkerii considerați: AST, ALT, PCR, replicarea virală, AFP, GGT, FA, VSH, fibrinogen și al fibrozei hepatice în faza acută a hepatitei virale C.

Metodologia generală a cercetării științifice

Studiul de față este un trial clinic intervențional, prospectiv, randomizat, dublu-orb ce a inclus o cohortă inițială de 104 pacienți în perioada februarie 2020- decembrie 2020. Au fost incluși voluntari sănătoși ce au constituit lotul control și pacienți infectați cu VHC în fază replicativă, acută, fără tratament antiviral anterior.

Toate procedurile clinice s-au realizat în urma aprobării Consiliului de Etică al Institutului Clinic Fundeni (48358/01/10/2019) în acord cu directiva 2001/20/EC a Consiliului European și respectând normele de confidențialitate a datelor cu caracter personal conform directivei europene 95/46/EC. Consimțământul informat a fost obținut de la toți subiecții incluși în studiu.

Pacienții prezentând ciroză decompensată, boală renală cronică, speranță de viață sub 12 luni, insuficiență cardiacă decompensată, afectare extrahepatică în cadrul infecției cu VHC, consumul de alcool sau de substanțe stupefiante, co-infecție VHB sau HIV, au fost excluși din studiu. Douzeci și cinci de pacienți au prezentat cel puțin un criteriu de excludere. Alți 16 pacienți au refuzat înrolarea în studiu iar 9 pacienți nu au prezentat RVS la terapia antivirală directă.

Din cei 63 de pacienți rămași, 36 de pacienți, voluntari sănătoși au constituit lotul control iar 27 de pacienți au constituit lotul de studiu. Cei 27 de pacienți incluși în lotul de studiu au fost evaluați în momentul diagnosticului infecției VHC și la 3 luni distanță după obținerea RVS secundar terapiei antivirale cu agenți direcți.

Etapele constituirii loturilor de studiu este redată în Fig. 14

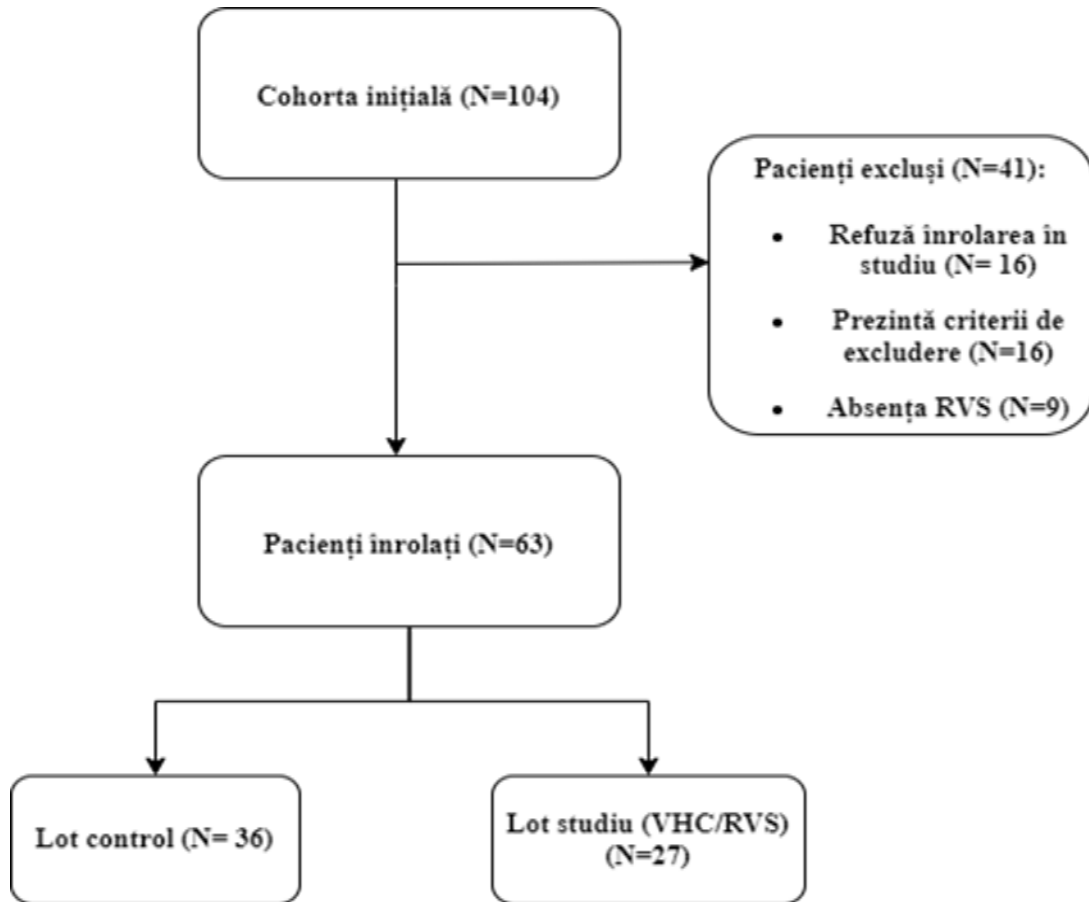


Figura 1 Flowchart cu loturile studiate

Așadar loturile analizate au fost:

- Lot Control (n=36) constituit din voluntari sănătoși
- Lot VHC (n=27) constituit din pacienți infectați cu VHC în momentul diagnosticului, în fază replicativă
- Lot SVR (n=27) constituit din pacienți cu răspuns viral susținut la 3 luni de la inițierea terapiei cu agenți antivirali direcți.

Analiza dinamicii AFP în hepatita virală C

Prima fază a lucrării doctorale s-a axat pe analiza comparativă a datelor demografice. S-au considerat următorii parametri: vârsta, genul pacientului, statutul social, statutul de fumător, indicele de masă corporală.

Markerii biochimici au fost testați în laboratorul clinic după un protocol local. Sânge integral de la fiecare pacient a fost recoltat în vacutainere dedicate și menținute la 4°C până când proba s-a coagulat. După coagulare, probele au fost centrifugate timp de 20 de minute la 1000xg iar detrimările au fost procesate imediat pentru markerii enunțați mai jos.

S-au determinat spectrofotometric nivelul plasmatic al albuminei (g/dl), AST (U/l), ALT (U/l), GGT (U/l), FA (U/l), BD (mg/dl), BT (mg/dl), PCR (mg/l), trigliceride (mg/dl) și colesterol total (mg/dl), folosind kituri compatibile pentru Siemens Advia 1800 Reader (Siemens, Erlangen-Germany). Nivelul plasmatic al AFP (ng/ml) și prezența crioglobulinemiei mixte au fost determinate cu ajutorul aparatului Advia Centaur XPT Reader (Siemens, Erlangen-Germany) prin chemiluminiscență. Hemograma a fost determinată automat cu ajutorul unui kit dedicat prin citometrie de flux (Sysmex XN-1000 Reader) (Sysmex, Kobe- Japan) iar rezultatele au fost exprimate per ml sânge.

Coagulograma a fost realizată din mostre de sânge recoltate pe vacutainere cu EDTA, conform recomandărilor producătorului cu ajutorul StaR Max 3 Reader (Stago, France). Au fost determinați următorii parametri: aPTT (sec), PT/INR (sec) și fibrinogenul plasmatic.

Nivelul replicării virale a fost stabilit cu ajutorul RT-PCR (Montania 4896 Real Time PCR Reader, Anatolia, Istanbul- Turkey), folosind kitul de cuantificare Bosphore HCV quantification (Anatolia, Istanbul-Turkey), conform recomandărilor producătorului. Principalele etape au inclus: colectarea ARN total, reverse transcrierea și amplificarea genei de interes, conform protocolului total. Determinările s-au realizat în triplicat iar replicarea virală a fost exprimată în copii virioni/ml.

Pentru aprecierea non-invazivă a fibrozei hepatice s-a folosit tehnologia FibroScan®, model 530 compact (Echosens, France). Rezultatele au fost exprimate în kPa.

Analiza biomarkerilor epigenetici în HVC în absența HCC

Pentru determinarea speciilor de miRNA considerate, ARN total a fost izolat din 200 µl de plasmă cu ajutorul kitului miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Hilden, Germany), fiind omogenizat în 20 µl, în acord cu recomandările producătorului. O cantitate de 3 µl de ARN astfel obținut, a

fost reverse transcris într-un volum total de 10 µl cu ajutorul kitului miRCURY LNA RT (Qiagen, Hilden, Germany), în acord cu recomandările producătorului.

Pentru fiecare probă, șase reacții de amplificare a 1 µl de cDNA per reacție au fost realizate cu ajutorul miRCURY miRNA Assays (Qiagen, Hilden, Germany). Speciile de miR considerate au fost: miR-7-1-3p, miR-21-3p, miR122-5p, miR-885-5p și miR-16-5p (control endogen). Reacțiile s-au desfășurat conform recomandărilor producătorului folosind aparatul PCR 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Valorile Ct obținute au fost normalizate la control prin metoda dublu delta Ct, considerând miR-16-5p controlul endogen la sugestia Qiagen și după verificarea stabilității folosind algoritmul (125). Nivelul plasmatic al miR a fost exprimat ca variație față de control (fold-change) pentru analiza comparativă între loturile de studiu și ca $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru analiza corelativă.

Rezultate

Date demografice

Distribuția pe genuri ale pacienților a relevat un procent de 47.2% bărbați în lotul control față de 30.7% în lotul de studiu ($p=NS$). În lotul control, au fost identificați 22.2% de pacienți fumători în timp ce în lotul de studiu ponderea lor a fost de 34.6% ($p=NS$). În lotul control, 75% au provenit din mediul urban, față de 61.5%-ponderea pacienților proveniți din mediul urban în lotul de studiu.

Vârsta medie în lotul control a fost de 50 ± 2.3 ani față de 61.8 ± 2.3 ani în lotul de studiu ($p=NS$). În ceea ce privește distribuția pacienților în loturile studiate, se constată o valoare medie a BMI de 25.6 ± 3.8 kg/m² în cadrul lotului control, comparativ cu 27.06 ± 5.6 kg/m² în lotul de studiu.

Studiul AFP

Analiza comparativă a nivelului mediu plasmatic al AFP în loturile studiate este redată în Fig. 2. Se observă nivelul plasmatic crescut al AFP atât în faza acută (lotul HVC) cât și la distanță, după un răspuns viral susținut (lotul RVS) față de lotul control: 5.79 ± 0.7 vs. 2.4 ± 0.3 , $P=0.0009$, respective 5.9 ± 2.5 vs. 2.4 ± 0.27 , $P=0.042$. Nu au fost observate diferențe semnificative statistice între loturile VHC și RVS: 5.79 ± 0.73 vs. 5.9 ± 2.5 , $P=NS$.

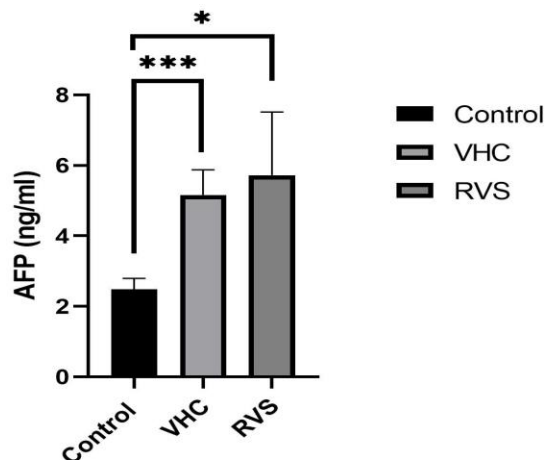


Figura 2 Analiza comparativă între loturile de studiu a concentrației plasmatice a AFP. Datele sunt exprimate în medii \pm eroare standard a mediei. * semnifică $p=0.05-0.01$ iar *** semnifică $p=0.001-0.0001$

Prezența crioglobulinemiei mixte este redată în Fig. 3. Am observat o creștere a incidenței crioglobulinemiei mixte în lotul VHC comparativ cu lotul Control (46% vs. 14%, $p<0.0001$). De asemenea, incidența crioglobulinemiei mixte a scăzut în lotul RVS față de lotul VHC (25% vs. 46%, $p<0.0001$).

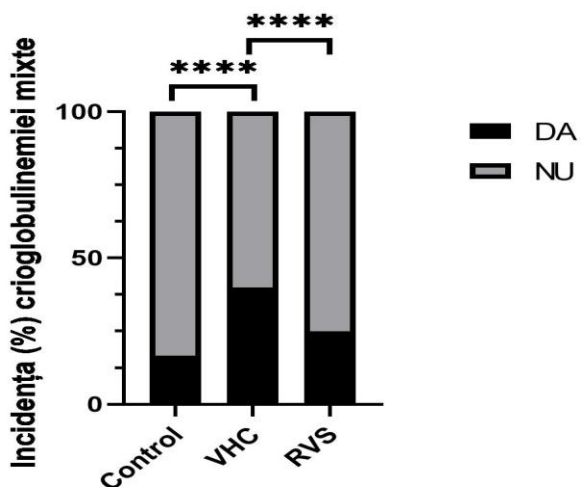


Figura 3 Incidența crioglobulinemiei mixte în loturile studiate. **** semnifică $p<0.0001$

Analiza comparativă a gradului fibrozei hepatice în loturile de studiu sunt redată în Fig. 4. Se observă un grad crescut al fibrozei atât în lotul VHC cât și în lotul RVS comparativ cu lotul control: 9.8 ± 0.9 vs. 4.5 ± 0.37 , $p=0.001$, respectiv 13 ± 3.2 vs. 4.5 ± 0.37 , $p=0.0006$. Nu s-a observat diferență semnificativă statistic între loturile VHC și RVS: 9.8 ± 1 vs. 13 ± 3.2 , $p=NS$.

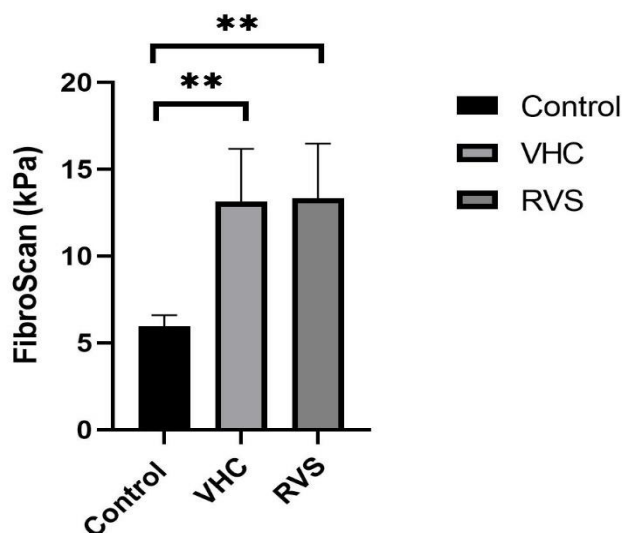


Figura 4 Comparație a gradului fibrozei între loturile studiate (FibroScan®). ** reprezintă $p=0.01-0.001$

Analiza corelativă a nivelului plasmatic al AFP cu parametri considerați se observă în Fig. 5, 6, 7, 8, 9, și 10. Se observă o corelație pozitivă, semnificativă statistic între valorile AFP și AST ($R^2=0.37$, $p=0.0001$), ALT ($R^2=0.37$, $p=0.0002$), BT ($R^2=0.3$, $p=0.0009$), GGT ($R^2=0.38$, $p=0.0001$), FA ($R^2=0.45$, $p<0.0001$) și negativă între AFP și fibrinogenemia ($R^2=0.15$, $p=0.002$).

Nu s-au observat corelații semnificative statistic între nivelul plasmatic al AFP și FibroScan® ($R^2=0.0007$, $p=0.88$), nivelul multiplicării virale ($R^2=0.0009$, $p=0.86$), Trombocite ($R^2=0.9$, $p=0.08$) sau PCR ($R^2=0.01$, $p=0.64$).

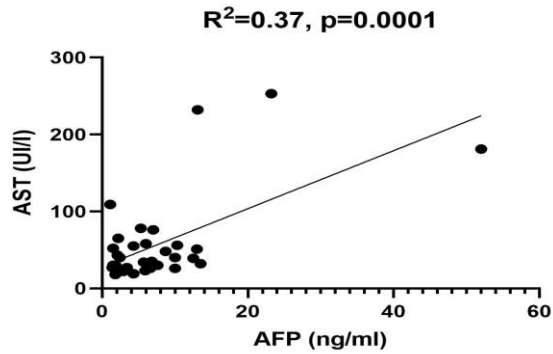


Figura 5 Analiza corelativă a valorilor alfa-fetoproteinei și ale AST. R^2 reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice.

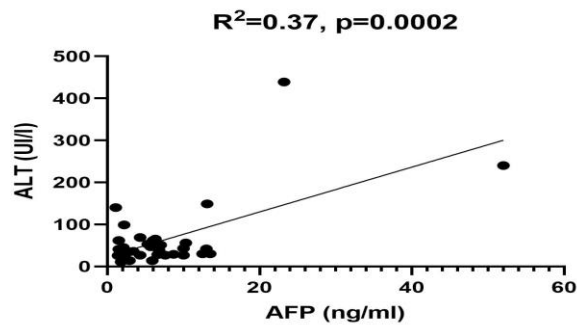


Figura 6 Analiza corelativă a valorilor alfa-fetoproteinei și ale ALT. R^2 reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice.

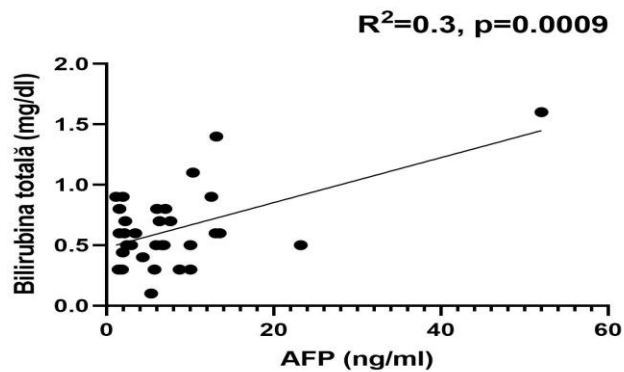


Figura 7 Analiza corelativă a valorilor alfa-fetoproteinei și ale bilirubinei totale . R^2 reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice.

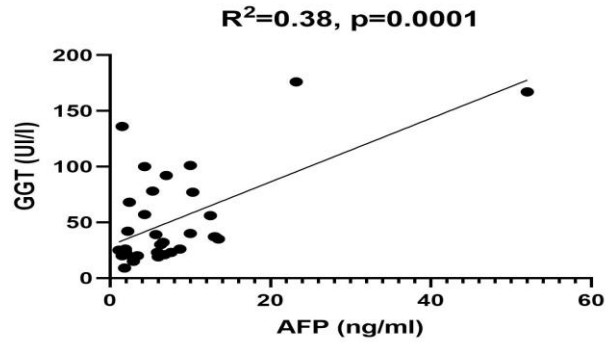


Figura 8 Analiza corelativă a valorilor alfa-fetoproteinei și ale GGT. R² reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice.

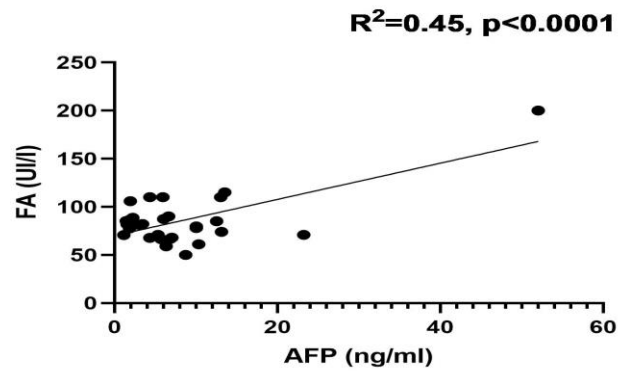


Figura 9 Analiza corelativă a valorilor alfa-fetoproteinei și ale FA. R² reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice.

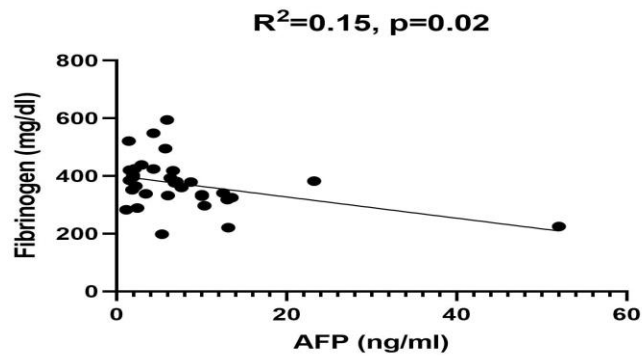


Figura 10 Analiza corelativă a valorilor alfa-fetoproteinei și ale fibrinogenului plasmatic. R² reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice

Biomarkeri epigenetici in HVC fără HCC

Analiza comparativă a expresiei miR 7-1-3p între loturile studiate este redată în Fig 11. Nu s-a observat nicio diferență între loturile Control și VHC (1 ± 0.2 vs. 0.65 ± 0.08 , $p = \text{NS}$). S-a observat o supraexpresie a miR 7-1-3p în lotul RVS față de lotul HVC: 1.03 ± 0.11 vs. 0.65 ± 0.08 ($p < 0.006$).

Suplimentar nu s-a corelat nivelul miR 7-1-3p cu niciun marker considerat : AST ($R^2 = 0.007$, $p = 0.67$), ALT ($R^2 = 0.08$, $p = 0.16$), PCR ($R^2 = 0.32$, $p = 0.23$), viremia ($R^2 = 0.07$, $p = 0.18$), AFP ($R^2 = 0.01$, $p = 0.54$), GGT ($R^2 = 0.03$, $p = 0.47$), FA ($R^2 = 0.01$, $p = 0.75$), VSH ($R^2 = 0.15$, $p = 0.09$), FibroScan® ($R^2 = 0.01$, $p = 0.54$).

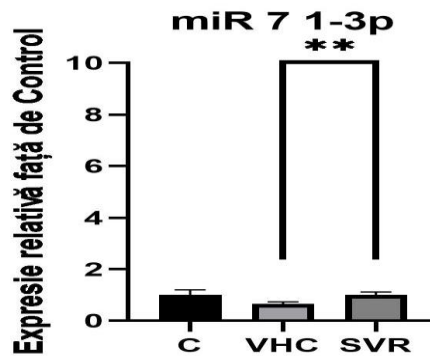


Figura 11 Expresia relativă a miR 7-1-3p între loturile de studiu. Rezultatele sunt exprimate ca medii ± eroare standard a mediei. ** semnifică $p = 0.01 - 0.001$

S-a observat supraexpresia MiR 21-3p în grupul RVS față de lotul Control: 2.76 ± 0.52 vs. 1 ± 0.29 , $p = 0.17$ (Fig. 12).

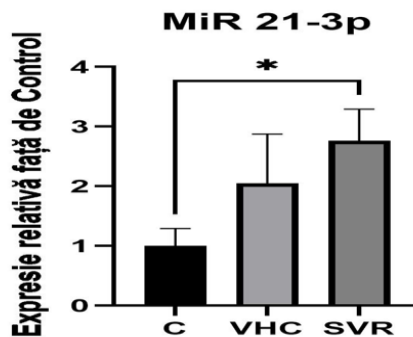


Figura 12 Expresia relativă a miR 21-3p între loturile de studiu. Rezultatele sunt exprimate ca medii ± eroare standard a mediei. *semnifică $p = 0.05 - 0.01$

Analiza corelativă a expresiei miR 21-3p cu markerii standard considerați nu a identificat nicio relație semnificativă statistic: AST ($R^2=0.0001$, $p=0.95$), ALT ($R^2=0.001$, $p=0.87$), PCR ($R^2=0.21$, $p=0.35$), viremie ($R^2=0.03$, $p=0.75$), AFP ($R^2=0.03$, $p=0.41$), GGT ($R^2=0.1$, $p=0.19$), FA ($R^2=0.0001$, $p=0.98$), VSH ($R^2=0.11$, $p=0.15$), FibroScan® ($R^2=0.01$, $p=0.57$).

În ceea ce privește expresia MiR-122 în plasmă, s-a observat supraexpresia acestui marker atât în lotul VHC cât și în lotul RVS față de lotul Control: 6.24 ± 1.5 vs. 1 ± 0.3 ($p < 0.001$), respectiv 3.96 ± 0.72 vs. 1 ± 0.3 ($p < 0.001$) (Fig. 13).

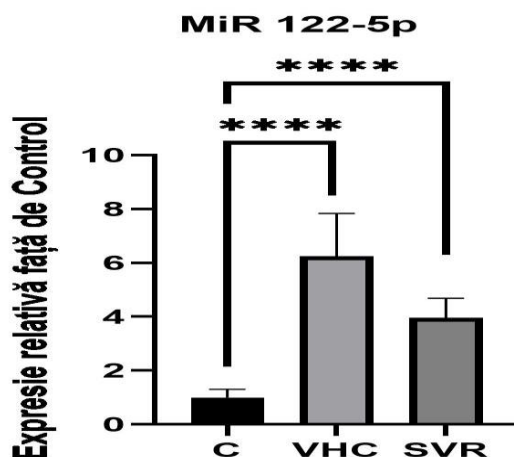


Figura 13 Expresia relativă a miR 122-5p între loturile de studiu. Rezultatele sunt exprimate ca medii ± eroare standard a mediei. **** semnifică $p < 0.0001$

Nivelul plasmatic al miR 122-5p s-a corelat pozitiv cu valorile AST ($R^2=0.35$, $p=0.0018$), ALT ($R^2=0.3$, $p=0.0045$) și PCR ($R^2=0.76$, $p=0.022$) (Fig. 14-16). Ceilalți markeri nu au sugerat corelații semnificative statistic în asociere cu miR 122-5p: viremie ($R^2=0.03$, $p=0.37$), AFP ($R^2=0.009$, $p=0.65$), GGT ($R^2=0.11$, $p=0.15$), FA ($R^2=0.0006$, $p=0.93$), VSH ($R^2=0.001$, $p=0.85$), FibroScan® ($R^2=0.008$, $p=0.67$)

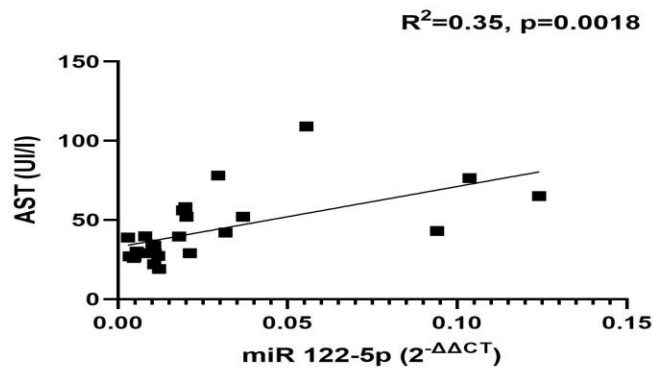


Figura 14 Corelații ale expresiei miR 122-5p cu nivelul plasmatic al AST. R^2 reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice

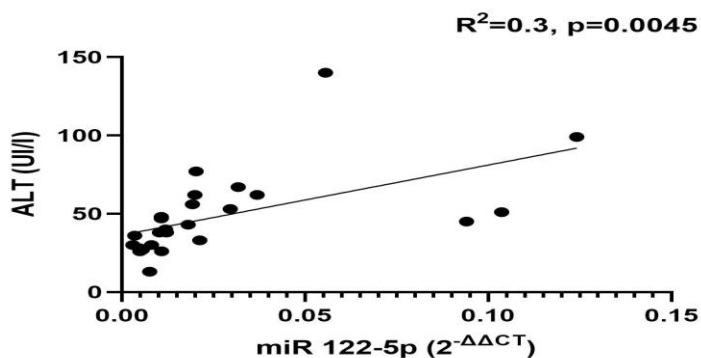


Figura 15 Corelații ale expresiei miR 122-5p cu nivelul plasmatic al ALT. R^2 reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice

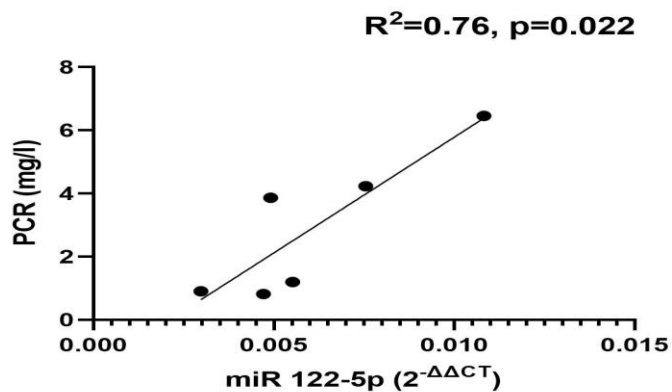


Figura 16 Corelații ale expresiei miR 122-5p cu nivelul plasmatic al PCR. R^2 reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice

În ceea ce privește miR-885-5p, s-a constatat o supraexpresie în lotul VHC comparative cu lotul Control: 7.57 ± 1.7 vs. 1 ± 0.31 , $p < 0.001$ și o subexpresie a acestuia în lotul RVS față de lotul VHC: 2.96 ± 0.44 vs. 7.57 ± 1.7 , $p = 0.007$. Suplimentar, s-a observat o supraexpresie a miR 885-5p în lotul RVS față de lotul Control: 2.96 ± 0.44 vs. 1 ± 0.31 , $p = 0.001$ (Fig. 17).

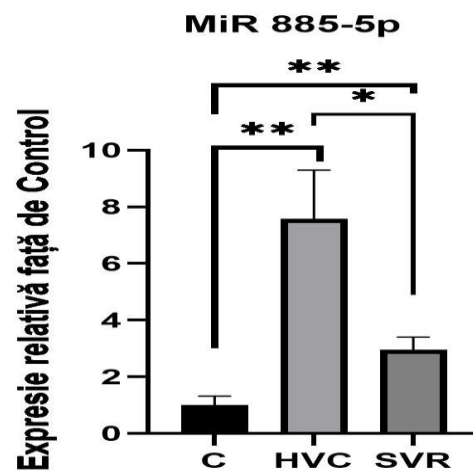


Figura 17 Expresia relativă a miR 885-5p între loturile de studiu. Rezultatele sunt exprimate ca medii \pm eroare standard a mediei. **** semnifică $p < 0.0001$

Analiza corelativă a nivelului plasmatic al miR 885-5p cu markerii standard considerați au relevat corelații pozitive semnificative statistice ale acestuia cu nivelul plasmatic al AST ($R^2 = 0.16$, $p = 0.04$) și PCR ($R^2 = 0.9$, $p = 0.03$) (Fig. 18-19).

Celelalte ipoteze corelative au fost invalidate: ALT ($R^2 = 0.06$, $p = 0.22$), viremie ($R^2 = 0.03$, $p = 0.39$), AFP ($R^2 = 0.0002$, $p = 0.93$), GGT ($R^2 = 0.2$, $p = 0.057$), FA ($R^2 = 0.005$, $p = 0.82$), VSH ($R^2 = 0.0001$, $p = 0.96$), FibroScan® ($R^2 = 0.01$, $p = 0.52$).

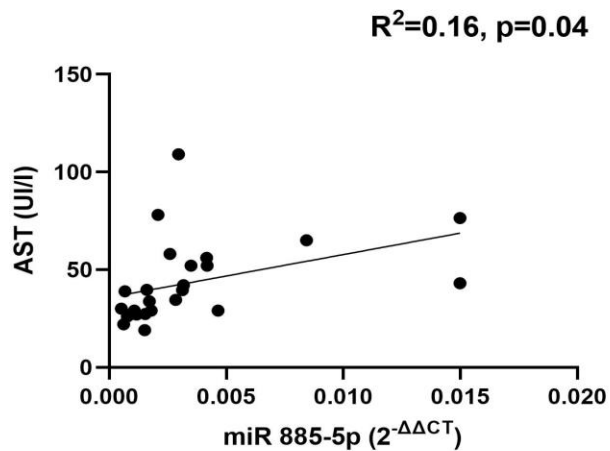


Figura 18 Corelații ale expresiei miR 885-5p cu nivelul plasmatic al AST. R² reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice

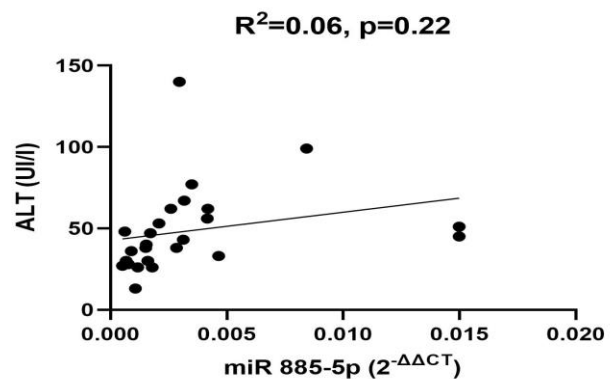


Figura 19 Corelații ale expresiei miR 885-5p cu nivelul plasmatic al ALT. R² reprezintă coeficientul de corelație; p reprezintă valoarea semnificației statistice

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE:

Concluziile tezei doctorale sunt:

- Nivelul plasmatic al AFP, deși se află sub valoarea prag pentru diagnosticul biochimic al unui HCC, are valori crescute atât la pacienții cu VHC în faza inițială, replicativă, cât și la distanță, după RVS secundar terapiei antivirale cu agenți direcți.
- Incidența crioglobulinemiei mixte este crescută în cazul pacienților cu VHC pentru ca apoi să scadă în condițiile unui RVS secundar terapiei.
- VHC poate determina încă din fazele incipiente ale infecției, fibroză hepatică, ce se menține și la 3 luni, în ciuda RVS postterapie.
- Nivelul plasmatic al AFP în cazul pacienților cu VHC la debut se corelează pozitiv cu amplitudinea sindromului de citoliză hepatică relevant prin nivelul AST și ALT.
- Nivelul AFP din sângele pacienților cu VHC se corelează pozitiv cu amplitudinea sindromului de colestază relevant prin nivelul FA, GGT și BT.
- Fibrinogenemia pacienților cu VHC în faza replicativă se corelează negativ cu nivelul plasmatic al AFP.
- RVS secundar terapiei antivirale bazată pe agenți antivirali direcți, determină o creștere a miR 7-1-3p plasmatic față de etapa inițială, de replicare virală.
- MiR 21-3p crește în plasma pacienților cu RVS secundar terapiei antivirale față de voluntarii sănătoși.
- Infecția acută cu VHC determină supraexpresia plasmatică a miR 122-5p, în timp ce secundar tratamentului antiviral, acest biomarker epigenetic va scădea.
- Nivelul plasmatic al miR 122-5p se corelează pozitiv cu intensitatea sindromului de citoliză hepatică în faza acută, replicativă a infecției cu VHC.
- MiR 885-5p este supraexprimat în infecția acută VHC și scade ulterior, secundar RVS, putând fi un marker de apreciere a evoluției infecției cronice cu VHC precum și a răspunsului terapeutic.
- Există o corelație directă minoră între nivelul miR 885-5p și ALT în cazul pacienților cu VHC, în fază replicativă.

- Statusul inflamator obiectivat cu ajutorul PCR se corelează pozitiv cu nivelul plasmatic al miR 122-5p și miR 885-5p.

Deși studii clinice viitoare sunt necesare pentru confirmarea ipotezelor și rezultatelor confirmate în lucrarea de față, am evidențiat un panel epigenetic inovativ în diagnosticul precoce al pacienților infectați cu VHC dar și de monitorizare a răspunsului la terapia antivirală cu agenți antivirali direcți.

În plus, am relevat potențiale corelații ale acestor biomarkeri cu analize biochimice și determinări sonografice standard.

De asemenea, am enunțat, prin analize comparative și corelative, rolul AFP în cazul pacienților infectați cu VHC în absența HCC precum și dinamica acestuia secundar terapiei antivirale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 13: 2436- 2441; 2007
- C T. Jake Liang, Barbara Rehermann, Leonard B. Seeff, Jay H. Hoofnagle. Pathogenesis, Natural History, Treatment, and Prevention of Hepatitis C. *Annals of Internal Medicine*; 2000
- Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology*. 47:321; 2008
- Sebastiani G, Gkouvatsos K, Plebani M. Non-invasive assessment of liver fibrosis: it is time for laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med*. 49:13–32; 2011
- Klibansky DA, Mehta SH, Curry M, Nasser I, Challies T, Afdhal NH. Transient elastography for predicting clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *J Viral Hepat*. 19(2):e184–e193; 2012
- Stephen A. Harrison. Utilization of FibroScan Testing in Hepatitis C Virus Management. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 11(3): 187–189; 2015
- Hashem B. El-Serag, Fasiha Kanwal, Peter Richardson, and Jennifer Kramer · Risk of Hepatocellular Carcinoma after Sustained Virologic Response in Veterans with HCV-infection Running Head: HCC after SVR. *Hepatology*. 64(1): 130–137; 2016
- Jacinta A Holmes, Stephanie M Rutledge, Raymond T Chung. Direct-acting antiviral treatment for Hepatitis C. *The Lancet*. 393: 1392-1394; 2019
- Hans Helmut Niller , Hans Wolf, Janos Minarovits. Viral hit and run-oncogenesis: genetic and epigenetic scenarios. *Cancer Lett*. 305(2):200-17; 2011
- Shira Perez , Antony Kaspi, Tom Domovitz , Ateret Davidovich et al. Hepatitis C virus leaves an epigenetic signature post cure of infection by direct-acting antivirals. *PLoS Genet*. 15(6): e1008181; 2019
- Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 5(1) : 167-75; 2012
- Jopling, C. Liver-specific microRNA-122: biogenesis and function. *RNA Biol*. 9: 137–142 ; 2012

Roberts, A. P. E., Lewis, A. P. & Jopling, C. L. MiR-122 activates Hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res.* 39: 7716–7729; 2011

Junhao Gui , Yaping Tian, Xinyu Wen, Wenhui Zhang, Pengjun Zhang, Jing Gao, Wei Run, Liyuan Tian, Xingwang Jia, Yanhong Gao. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies, *Clin Sci (Lond)* .120(5):183-93; 2011