



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. DR. ILIESCU ELENA LAURA**

**Student-doctorand:**

**STANCU GEORGE**

**2024**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**DOMENIUL MEDICINĂ INTERNĂ**

*UTILITATEA PSEUDOCOLINESTERAZEI SERICE*

*ÎN EVALUAREA, STADIALIZAREA ȘI PROGNOSTICUL*

*INSUFICIENȚEI HEPATICE*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. ILIESCU ELENA LAURA**

**Student-doctorand:**

**STANCU GEORGE**

**2024**

## Cuprins

Introducere .....	4
I. Partea generală .....	5
1. Colinesterazele serice .....	5
1.1 Pseudocolinesteraza serică .....	6
1.2 Variante de pseudocolinesterază serică .....	6
1.3 Valorile normale ale pseudocolinesterazei serice .....	7
2. Insuficiența hepatică .....	7
3. Metode de evaluare a insuficienței hepatice .....	8
4. Limitări în utilizarea scorurilor actuale .....	9
5. Utilitatea colinesterazei în evaluarea insuficienței hepatice .....	9
2 Contribuții personale .....	11
6. Ipoteza de lucru și obiectivele generale .....	11
7. Studiul 1- Corelații între valoarea pseudocolinesterazei serice și scorurile Child-Pugh și MELD-Na .....	15
7.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice) .....	15
7.2 Pacienți și Metoda .....	15
7.3 Rezultate .....	16
7.4 Discuție .....	17
7.5 Concluzii .....	18
8. Studiul 2 - Variația nivelului pseudocolinesterazei colinesterazei serice în cursul tratamentului cu antivirale directe pentru hepatita cronică cu virus C .....	19
8.1 Introducere .....	19
8.2 Pacienți și metode .....	19
8.3 Rezultate .....	19
8.4 Concluzii .....	20
9. Studiul 3 - Prezentare de caz Variația Pseudocolinesterazei serice înainte și după transplantul hepatic .....	20
9.1 Introducere .....	20
9.2 Prezentarea cazului .....	21
9.3 Discuție .....	22
9.4 Concluzie .....	22
10. Studiul 4 : Relația dintre pseudocolinesteraza serică și supraviețuire .....	22
10.1 Introducere .....	22
10.2 Pacienți și metodă .....	23
10.3 Rezultate .....	26
10.4 Concluzii .....	30
11. Concluzii și contribuții personale .....	31
12. Lista lucrărilor științifice publicate .....	33
Bibliografie selectivă .....	33

## Introducere

Hepatopatiile cronice reprezintă o patologie foarte frecventă atât la nivel mondial cât și la nivel național. La nivel mondial, se estimează că 1,5 miliarde de persoane suferă de o hepatopatie cronică (1) iar în cazul cirozei hepatice incidența corelată cu vârsta este de 20.7/100,000, cu o creștere de 13% față de anul 2000.

În România, datele prezentate de Organizația Mondială a Sănătății arată că mortalitatea secundară cirozei hepatice este în top 10 pe locul 6 pentru femei și pe locul 4 în cazul bărbaților (5).

Identificarea etiologiei hepatopatiei este un moment crucial în evoluția pacientului ce poate schimba complet atitudinea terapeutică uneori sub presiunea timpului.

Al doilea plan este reprezentat de evaluarea severității hepatopatiei și implicat a prognosticului. Se încearcă evaluarea funcției și a integrității structurale hepatice și se estimează speranța de viață (7).

În prezent, stadializarea hepatopatiei se face utilizând scoruri ( scorul Child Pugh, scorul Meld Na, Fibromax) sau teste funcționale iar evaluarea gradului de fibroză prin metode neinvazive cu ajutorul ultrasunetelor sau tehnici invazive cum ar fi biopsia hepatică (7). Scorurile utilizate în prezent identifică în special prezența cirozei (stadiul final al bolii hepatice) (8). Din acest motiv stadiile intermediare, predecesoare instalării cirozei nu sunt identificate cu ușurință și astfel pacienții cu hepatopatii cronice au iluzia unei evoluții staționare până la instalarea cirozei (2).

Înainte unei intervenții chirurgicale sau radiologice ce ar provoca pierderea unei fracțiuni din volumul hepatic este necesară evaluarea rezervei funcționale hepatice din punct de vedere al funcției hepatice restante post procedurale (9). Segmentele hepatice îndepărtate chirurgical provoacă instantaneu o scădere proporțională a funcției hepatice (10) iar procedurile radiologiei intervenționale de chemoembolizare a ramurilor arterei hepatice provoacă de asemenea o pierdere a masei hepatice atât structural și funcțional (11). Atât rezecțiile chirurgicale cât și embolizările afectează structural rezerva funcțională hepatică și necesită o evaluare pre procedurală temeinică pentru a nu ne afla în situația în care parenchimul hepatic restant nu asigură o rezervă funcțională hepatică suficientă pentru menținerea în continuare a vieții și a nu induce insuficiența hepatică acută post procedurală (12). Pentru a evita această situație se folosesc scoruri, teste funcționale, aprecieri imagistice volumetrice și biopsii hepatice.

Dintre scoruri, scorul Child-Pugh (CTP) este unul dintre cele mai folosite la nivel global fiind un instrument gândit inițial pentru a prezice mortalitatea pacienților cirofici. Conceput inițial de către Child și Turcotte în 1964 pentru a selecta pacienții ce ar beneficia de o intervenție chirurgicală pentru decompresia portală. Acest scor împarte pacienții în 3 categorii : A - rezervă hepatică bună, B – funcție hepatică moderat diminuată și C – disfuncție hepatică severă. Acest scor utilizează 5 elemente clinice și de laborator pentru a evalua pacienții : bilirubină serică, albumina serică, ascita, tulburări neurologice și statusul nutrițional. Acest scor a fost modificat ulterior de către Pugh et al., înlocuind statusul nutrițional cu timpul de protrombină (13). În plus au introdus sistemul cu puncte corelat cu severitatea. Scorul Child-Pugh este folosit până în prezent cu succes la nivel global de către medici de pe toate continentele însă acest scor este, după cum am precizat anterior, gândit pentru pacienți cirofici, folosind elemente de evaluare alese relativ arbitrar. Din acest motiv este posibil ca scorul CTP să nu reflecte scăderi ale rezervei funcționale hepatice instalate înainte de atingerea stadiului de ciroză al bolii cronice de ficat (14).

Pseudocolinesteraza serică sau butirilcolinesteraza (BCHE) ar putea fi soluția evaluării pacienților cu boli hepatice cronice atât în stadii precirofice cât și cirofice (15). Această enzimă este cunoscută de comunitatea științifică însă nu are notorietatea necesară utilizării pe scară largă. Având o sinteză hepatică, timp de înjumătățire scurt, nivelul plasmatic nefiind ușor de influențat și având un preț extrem de mic poate fi o soluție pentru estimarea funcției hepatice și poate fi utilă în dezvoltarea unui nou scor pentru stadializarea bolilor hepatice cronice cu o sensibilitate crescută în etapele incipiente ale bolii (15). Acestea sunt **motivele pentru care pseudocolinesteraza serică este subiectul acestei teme de cercetare.**

## I. Partea generală

### 1. Colinesterazele serice

Descoperite în 1968 de către Walo Leuzinger et al. de au reușit să purifice și să cristalizeze acetilcolinesterază din țipari electrici la Universitatea Columbia din New York (16) colinesterazele serice sunt enzime din clasa hidrolazelor care au rolul de a hidroliza esterii ai colinei (19). Unii esterii ai colinei au rol de neurotransmițători, cel mai cunoscut substrat fiind acetilcolina. Acetilcolina este neurotransmițătorul sinapsei colinergice (20) și este hidrolizată de către acetilcolinesterază (ACHE) în colină și acid acetic. Acetilcolinesteraza se găsește în sinapse și în membrana eritrocitelor.

Mai exista un tip de colinesterază numită butirilcolinesteraza (BCHE) sau pseudocolinesteraza sau colinesteraza serica ce se găsește în plasmă și este sintetizată de către ficat. Diferența dintre cele 2 tipuri de colinesteraza este afinitatea fiecăreia pentru un anumit substrat. Acetilcolinesteraza hidrolizează mai eficient acetilcolina iar pseudocolinesteraza sau butirilcolinesteraza (BCHE) este mai rapidă în hidrolizarea butirilcolinei (21), (22).

### 1.1 Pseudocolinesteraza serică

Butyrylcholinesterase (HGNC simbol BCHE; EC 3.1.1.8), denumită alternativ ca și BChE, BuChE, BuChase, pseudocolinesterază, colinesteraza plasmatică sau colinesterază serică, este o enzimă tip colinesterază nespecifică sintetizată în ficat și este găsită în plasmă. Este codificată de gena BCHE (19).

Determinarea activității BCHE în sânge poate fi utilizată ca un test al funcției hepatice având în vedere că atât valorile crescute cât și cele scăzute au semnificație patologică (34).

Are un timp de înjumătățire de 10-14 zile. Nivelul seric al BCHE este mai scăzut în cazul pacienților cu boala hepatică avansată. Dacă scăderea nivelului plasmatic este mai mare de 75%, va provoca prelungirea blocadei neuromusculare la administrarea de succinilcolină (34), (24).

BCHE nu are o funcție fiziologică unică ce nu poate fi compensată de alte enzime. Oamenii și animalele de laborator ce nu au activitate a BCHE serică sunt sănătoși, fertili și trăiesc până la vârste înaintate (35), (36). Funcțiile pseudocolinesterazei devin vizibile când aceasta interacționează cu anumite substanțe. În cazul oamenilor, cocaina este detoxificată la un produs farmacologic inactiv în principal de către BCHE.

BCHE este una dintre esterazele care inactivează hormonul stimulant al apetitului octanoil-ghrelin (38). Faptul că BCHE ar putea avea un rol în metabolismul lipidelor a fost observat prin faptul că șoarecii cu deficit de BCHE devin obezi când sunt hrăniți cu o dietă bogată în grăsimi iar cei sălbatici nu devin obezi când li se administrează aceeași dietă. BCHE este studiată ca și agent terapeutic în prevenirea intoxicațiilor cu gaze toxice de luptă (30). Protecția se face prin inactivarea rapidă a agentului toxic de către BCHE.

### 1.2 Variante de pseudocolinesterază serică

Genă *BCHE* codifică pseudocolinesteraza (BChE), ce metabolizează succinilcolina. Au fost identificate peste 75 de variante genetice ale BCHE. Variante ale BCHE au fost

corelate cu deficiența activității enzimatice a BCHE ceea ce duce la niveluri mai mari decât cele așteptate ale succinilcolinei și, prin urmare, prelungirea blocadei neuromusculare. Pacienții cu aceste variante sunt de obicei asimptomatici până în momentul în care sunt expuși la succinilcolină ca și eveniment legat de o intervenție chirurgicală. Cea mai cunoscută variantă a BCHE este varianta ”atipică” (varianta A) (25).

### 1.3 Valorile normale ale pseudocolinesterazei serice

Pseudocolinesteraza serică are un nivel normal declarat de laboratoarele comerciale de analize clinice conform tabelului 1 (23).

*Tabel 1 Valori normale ale pseudocolinesterazei serice în prezent*

<i>Vârsta și sex</i>	<i>Valori (U/L)</i>
<i>copii, bărbați, femei &gt;40 ani</i>	5320-12920
<i>femei &lt;40 ani, care nu sunt gravide și nu iau contraceptive orale</i>	4260-11250
<i>femei &lt;40 ani, gravide sau care iau contraceptive orale<sup>2</sup></i>	3650-9120

Astfel, o valoare între 3650 și 1290 U/L ar putea să fie normală însă aceste valori sunt gândite ca indicator al unei posibile intoxicații cu insecticide. Screening-ul preoperator al BCHE este folosit pentru a depista pacienții cu forme atipice ale acestei enzime, care risca să prezinte apnee prelungită după administrarea de anestezice de tip blocante musculare.

Valori scăzute ale BCHE pot apărea în cazurile de intoxicație cu insecticide organofosforate, hepatita cronică, ciroza, infarct miocardic, infecții acute, în prezența fenotipurilor atipice ale acestei enzime (23). În cazul expunerii la steroizi anabolizanți, carbamați, cimetidină, ciclofosamidă, estrogeni, glucocorticoizi, litiu, neostigmina, relaxante neuromusculare (ex: pancuronium, succinilcolina), contraceptive orale, insecticide organofosforate, phenelzine, fenotiazine, fizostigmina, agenți radiologici de contrast (ex: acid iopanoic), ranitidina, streptokinaza, testosteron.

Valori crescute ale enzimei pot apărea în perioada de vindecare a unei hepatite acute, sindrom nefrotic (datorită exagerării funcțiilor proteosintetice hepatice) și în tumorile secretante de colinesterază.

## 2. Insuficiența hepatică

Insuficiența hepatică poate fi privită ca o afecțiune acută ce apare la un pacient fără o boală hepatică preexistentă și, în această situație, este folosit termenul de insuficiență hepatică acută.

O degradare progresivă, cu ritm susținut sau cu perioade de platou, pe parcursul mai multor ani a funcțiilor hepatice reprezintă insuficiența hepatică cronică.

Diagnosticul alterării funcției hepatice se face utilizând teste de laborator "stative" sau "dinamice" cum ar fi testul de clearance a indocyanine green. Transplantul hepatic rămâne tratamentul de elecție pentru insuficiența hepatică fulminantă, acută sau subacută cu prognostic nefavorabil estimat de criteriile King's College sau Clichy ideal în absența unei boli hepatice preexistente și înainte de apariția complicațiilor extrahepatice (33).

Cercetări actuale preclinice sugerează că moartea celulară programată reprezintă un mecanism important în patogeneza insuficienței hepatice acute și "acute-on-chronic" și astfel există posibilitatea unor tratamente medicamentoase antiapoptoză.

### 3. Metode de evaluare a insuficienței hepatice

Mai mulți markeri serici, indici hepatici și sisteme de scoruri au fost propuse pentru a rezolva această problemă și a putea oferi un prognostic. Cele mai utilizate sunt clasificarea Child-Pugh (CTP) și scorul Model of End-Stage Liver Disease (MELD). În plus, scoruri matematice care să combine markeri serici cum ar fi raportul aspartat aminotransferază (AST) / alanin aminotransferază (ALT) ratio (AAR), raportul AST/trombocite (APRI) și scorul fibrosis-4 (FIB-4) au fost dezvoltate pentru a identifica prezența și severitatea bolii cronice hepatice. În plus măsurătorile densității hepatice prin transient elastography (TE; Fibroscan) – o tehnologie ce se bazează pe măsurarea vitezei unei unde produse de un impuls mecanic – a atras atenția de-a lungul ultimilor ani (43).

Apariția fibrozei hepatice este un punct de cotitură în evoluția bolilor hepatice cronice iar prezența și severității fibrozei se corelează cu prognosticul fără a fi influențată de etiologie (44).

Biopsia hepatică este în continuare standardul de referință ce permite evaluarea detaliată a localizării și a gradului de fibroză (45) Cu toate că aduce informații extinse și rămâne în continuare o investigație cheie în hepatologie, dimensiunea specimenului de biopsie trebuie să fie destul de lung pentru a fi interpretat de experți și a aduce informații credibile.

Tehnicile non-invazive, repetabile și ideal mai ieftine sunt o alternativă în evaluarea fibrozei. Este important de menționat că măsurile de diagnostic al fibrozei în hepatopatiile cronice ar trebui să aibă o variabilitate mică inter și intraoperator pentru a fi posibilă o comparare a rezultatelor de-a lungul timpului iar fibroza este un proces dinamic și putând avea și o regresie. Testele non invazive ar trebui să aibă și capacitatea de prognostic în afară de evaluarea fibrozei și a complicațiilor acesteia (2).

Testele ce permit evaluarea hepatopatiilor cronice se pot clasifica în:

**a) teste serologice** ( markeri serici ai fibrozei; variabile de laborator);



**b) teste funcționale ”dinamice” hepatice ( indocyanine green);**

**c) metode ce evaluează proprietățile fizice ale țesutului hepatic (e.g. liver stiffness; attenuation; viscosity);**

**d) metode imagistice** ce evaluează anatomia ficatului și a altor organe. Aceste abordări pot fi considerate complementare în diverse situații. Trebuie subliniat că testele non invazive, biopsia hepatică și metodele invazive și elementele clinice trebuie integrate pentru a obține un diagnostic și o stadializare corectă în hepatopatiile cronice.

#### 4. Limitări în utilizarea scorurilor actuale

Evaluarea afectării hepatice este un pas important în cazul pacienților cu hepatopatii cronice. Cu toate că biopsia hepatică este investigația standard pentru stabilirea necro-inflamației și a fibrozei, are limitări ca orice procedură invazivă iar nevoia de repetare pentru monitorizarea în dinamică a bolii hepatice a dus la dezvoltarea unor teste noninvazive ca și alternativă la biopsie. Astfel de abordări neinvazive includ elemente biologice ( biomarkeri serici ) sau fizice ( evaluarea imagistică și a densității hepatice). Oricum testele disponibile în prezent au multe limitări cum ar fi variabilitatea, lipsa acurateței. Multe dintre testele curente au fost inițial dezvoltate pentru hepatită cronică C și apoi rafinate pentru NAFLD și apoi rafinate pentru prognosticul bolii cronice de ficat. O considerație importantă în ciuda utilizării din ce în ce mai frecvente în practica zilnică este faptul că nu sunt proiectate să reflecte dinamica procesului de fibroză , să diferențieze între stadii adiacente de boală, diagnosticul steatohepatitei non alcoolice sau urmărească modificări longitudinale ale fibrozei hepatice datorită evoluției naturale a bolii sau datorită intervențiilor terapeutice.

Înțelegând punctele forte și limitările ale acestor teste pot fi utilizate judicios în context clinic ele fiind mai degrabă complementare decât un înlocuitor al biopsiei hepatice.

#### 5. Utilitatea colinesterazei în evaluarea insuficienței hepatice

Relația dintre colinesterază și insuficiența hepatică este explorată de o multitudine de cercetători . Pseudocolinesteraza serică este un marker al funcției hepatice la pacienții cirofici (35) și nu numai pentru că este exclusiv sintetizată de către ficat ca și albumina și factorii de coagulare și astfel este de așteptat ca nivelul ei să scadă în cazul pacienților cu ciroză.

Multiple alte studii au examinat utilitatea BCHE ca și posibil test funcțional hepatic static însă concluziile au fost echivoce (98) (29) (99) (100) (101). Majoritatea acestor studii au examinat pacienți cu tumori hepatice sau icter obstructiv, condiții irelevante astăzi

datorită avansului tehnologic în radiologie. În plus au apărut tehnici noi ce au făcut măsurarea nivelului seric al pseudocolinesterazei mult mai simplu de efectuat.

Pacienții cirofici au un nivel mult mai scăzut al BCHE comparativ cu pacienții sănătoși. De asemenea, pacienții cu ciroză decompensată au un nivel al colinesterazei mai scăzut comparativ cu cei cu ciroză compensată. Chiar și după stratificarea pacienților conform scorului MELD diferențele au rămas semnificative. Prezența infecției sau a sângerării variceale nu a afectat rezultatele (102). Nivelurile serice ale pseudocolinesterazei au arătat o corelare excelentă cu albumina serică și o corelare rezonabilă cu bilirubina serică și INR ceea ce indică faptul că BCHE este un bun indicator al rezervei funcționale hepatice.

Faptul că nivelul seric al BCHE se corelează cu rezerva funcțională hepatică a fost dovedit în variate situații clinice (103). De exemplu în coleastăz intrahepatică familială, după drenajul biliar extern, creșterea nivelului BCHE arată reușita intervenției chirurgicale (104). Li Q et al au arătat că în cazul pacienților cu hepatită cronică severă, nivelul BCHE erau foarte scăzute și se corelau cu o mortalitate crescută. Autorii au sugerat un model de regresie logistică ce utilizează BCHE cu o valoare prognostică superioară MELD (36). Pentru că nivelul seric al BCHE aduce informații substanțiale despre rezerva funcțională hepatică, poate fi utilă în deciziile de a iniția intervenții chirurgicale non-hepatice, rezecții hepatice sau efectuarea șuntului transjugular intrahepatic portosistemic (TIPS).

Măsurarea nivelului seric al BCHE este o procedură extrem de simplă față de alte teste hepatice. Un nou scor ce folosește pseudocolinesteraza, albumina serică, și bilirubina a fost propus pentru predicția disfuncției hepatice postoperatorii la pacienții cardiaci cu disfuncție hepatică (105). Un model prognostic ce folosește albumina serică, dimensiunea varicelor și nivelul seric al BCHE a fost superior scorului Child-Pugh în prezicerea mortalității la 1, 3 și 5 ani într-o cohorta de pacienți cu ciroză alcoolică (106).

Cu toate că valorile normale ale BCHE par să varieze destul de larg, fiecare individ pare să își păstreze valoarea lui normală a BCHE de/a lungul vieții în circumstanțe normale (107). Valori scăzute ale BCHE în cazul unui pacient cirotic impun urmărirea acestuia și, dacă persistă la un nivel scăzut, poate fi considerată ca marker de prognostic prost a bolii hepatice. Îmbunătățirea nivelului BCHE poate fi interpretată ca răspuns la un tratament pentru ciroză cum ar fi inițierea tratamentului antiviral pentru hepatita B, tratamentul cu steroizi în hepatita autoimună sau terapia cu chemători pentru boala Wilson. Urmărirea pacienților arată rolul potențial al BCHE în identificarea acute-on-chronic liver disease. Decizii foarte importante cum ar fi nevoie de transplant hepatic pot fi luate în urma monitorizării acestui parametru.

Privind în ansamblu contribuția acestui test la diagnosticul, monitorizarea și prognosticul cirozei identifica câteva elemente importante. BCHE este un singur test biochimic disponibil foarte ușor și ieftin. Poate fi repetat ori de câte ori este nevoie. BCHE are o evoluție similară indiferent de etiologia bolii hepatice (14). În cazul pacienților anticoagulați ca și cei cu sindrom Budd Chiari, activitatea de protrombină și implicit INR-ul sunt inutilizabili în calculul scorurilor. De asemenea în cazul pacienților ce primesc tratament cu albumina umană pentru ascită refractară sau sindrom hepatorenal tip 2 , adevărata funcție de sinteză a ficatului este mascată însă poate fi evaluată prin dozarea BCHE. Astfel poate juca un rol important în evaluarea funcției hepatice în situațiile în care PT, INR și albumina nu pot fi folosite. Ogunkeye et al au sugerat că BCHE este un mijloc de diferențiere între prezența unei hepatopatii sau alte patologii în care sunt afectate testele utilizate în evaluarea bolilor hepatice (108). Valorile au tendința sa scadă odată cu reducerea rezervei funcționale hepatice (109). În cazul pacienților cu insuficiență renală coexistentă, când valoarea creatininei serice este elevată, scorul MELD nu poate fi utilizat pentru a estima severitatea bolii hepatice. Cu toate acestea rolul potențial al BCHE necesita studii extinse înainte de a se trage o concluzie. De asemenea , studii suplimentare sunt necesare pentru a garanta utilizarea BCHE în protocolul de alocare a organelor în vederea transplantului, în special în situațiile cu scor MELD mic cum ar fi prezența ascitei refractare. Dozări seriate în ACLF pot aduce informații suplimentare privind refacerea rezervei funcționale hepatice. Trebuie însă sa ne amintim că în plus față de insuficiența hepatică, niveluri scăzute ale BCHE pot să apară și în anemia cronică, neoplazii, insuficiența cardiacă, arsuri și radioterapie.

În concluzie, pseudocolinesteraza serică este un biomarker excelent pentru ciroza cu o sensibilitate și specificitate bună. Are o bună corelație cu albumina serică, PT, INR și scorul MELD.

Pentru că diferențiază bine ciroza compensată de cea decompensată, nivelurile scăzute ale BCHE pot fi considerate un alt marker de prognostic în boala hepatică avansată. Sunt necesare studii suplimentare pentru a defini locul ei în practica medicală.

## 2 Contribuții personale

### 6. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Evaluarea prezentei insuficienței hepatice este o necesitate atât în cazul pacienților cu hepatopatii cronice, pacienți cu hepatită acute-on-cronic și a pacienților ce urmează să efectueze proceduri chirurgicale sau radiologice intervenționale ce scad volumul hepatic.

În stadiile avansate, prezența insuficienței hepatice este ușor de evidențiat prin oricare dintre testele de laborator statice sau scoruri, teste dinamice sau evaluări ale volumului hepatic. Prezența cirozei este o garanție a asocierii concomitente a insuficienței hepatice însă în stadiile incipiente ale insuficienței hepatice sunt necesare teste cu o acuratețe mai mare pentru că, de multe ori testele statice nu sunt afectate.

Scorurile actuale sunt asocieri de parametrii clinici, ecografici, biochimici, analize de laborator, estimări fizice ale densității hepatice sau invazive – biopsia hepatică.

Hepatopatiile cronice afectează disproporționat diversele funcții hepatice.

Un nou scor de evaluare a stadiului bolii hepatice cronice mai sensibil este un instrument ce, estimând mai bine stadiul hepatopatiei, poate crește speranța de viață și poate ajusta tratamentul sau necesarul potențialelor proceduri necesare.

BCHE este utilizată frecvent în China, ea fiind inclusă în recomandările de evaluare a pacienților cu hepatopatii ale Societății de Gastroenterologie a PRC (110). Cu toate că țările asiatice utilizează acest parametru, în Europa și America nu este utilizată la același nivel.

Valoarea serică a BCHE ar putea estima gradul insuficienței hepatice din punct de vedere al capacității de sinteză proteică și, dacă se confirmă, împreună cu estimarea fizică a gradului de fibroză al parenchimului hepatic și alți parametrii biochimici ar putea sta la baza unui nou scor de evaluare a stadiului bolii hepatice.

Stabilirea intervalelor BCHE serice corespunzătoare celor 3 stadii ale cirozei hepatice stabilite prin scorul Child Pugh pentru un eșantion de pacienți caucazieni și apoi compararea acestor valori cu intervalele identificate de către Societatea de Gastroenterologie Chineza pentru a dovedi că sunt similare este **prima ipoteza de cercetare**.

Odată cu apariția noilor tratamente curative pentru hepatita cronică cu virus hepatic C ne-au pus într-o situație nouă: vindecarea unor pacienți cu o hepatopatie cronică. Acesta situație a permis identificarea evoluției nivelului BCHE înainte și după eliminarea virusului hepatic C și implicit evaluarea evoluției capacității de sinteză proteică hepatică după vindecare. **A doua ipoteză de cercetare** este creșterea nivelului BCHE după eliminarea virusului hepatic C și implicit creșterea rezervei funcționale hepatice după vindecare.

**A treia ipoteză de cercetare** este dovedirea creșterii nivelului BCHE după efectuarea unui transplant hepatic la un pacient cu ciroză hepatică. Teoretic valoarea BCHE după transplant ar trebui să se normalizeze.

**A patra ipoteza de lucru** este dovedirea caracterului predictiv nivelului pseudocolinesterazei serice asupra capacității de estimare a supraviețuirii a nivelului colinesterazei serice. Cu cât nivelul seric al pseudocolinesterazei este mai înalt cu atât este mai mare speranța de viață

În această lucrare am încercat rezolvarea acestor ipoteze de lucru însă subiectul poate avea multiple valențe de cercetare putând fi folositor și în evaluarea eficienței terapeutice a unor medicamente sau suplimente.

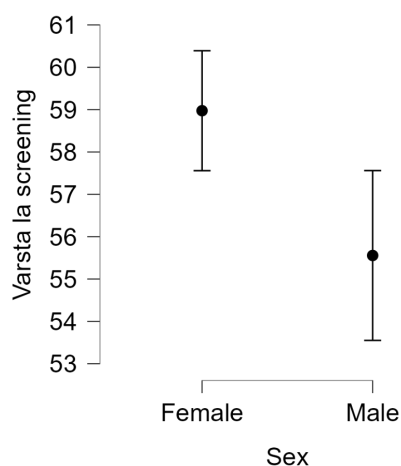
Obiectivul științific al acestei teze reprezintă dozarea nivelului seric al pseudocolinesterazei serice la un eșantion cât mai mare de pacienți cu hepatopatii cronice și apoi monitorizarea nivelului acesteia de-a lungul anilor pentru a identifica patternuri de evoluție, posibilitatea de influențare prin metode farmacologice și evaluarea capacității de estimare a supraviețuirii a nivelului seric al BCHE.

Am identificat 463 de pacienți caucazieni, 276 femei (59,61%) și 187 bărbați (40,3%) cu diverse patologii hepatice.



Figură 1 Distribuția pe sexe a lotului

Vârsta medie la intrarea în studiu a pacienților incluși în lot este de 58 ani (minim 21 ani, maxim 87 ani) iar pentru femei este de 58,97 ani SD 12, minim 21 ani, maxim 81 ani iar pentru bărbați vârsta medie este de 55,56 ani SD 13,99, minim 24 ani, maxim 87 ani .



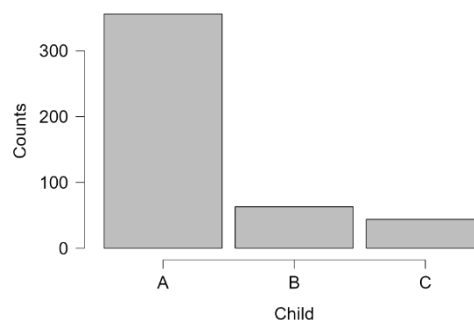
Figură 2 Interval plots / Vârsta pacienților la screening comparata pe sexe

Din punct de vedere al stadializării bolii hepatice cronice, cei 463 de pacienți se încadrează în categoriile scorului Child-Pugh (CTP) după cum urmează: Child A 356 pacienți, Child B 63 de pacienți iar Child C 44 pacienți ( Tabel 2, Figura 3).

#### Descrierea lotului conform stadiului CTP

Child	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
A	356	76.89	76.89	76.89
B	63	13.61	13.61	90.50
C	44	9.50	9.50	100.00
Total	463	100.00		

Tabel 2 Distribuția lotului după scorul CTP



Figură 3 Distribuția lotului conform stadiului CTP

Am început prin dozarea nivelului BCHE seric la pacienți cu diverse patologii hepatice și am obținut baza de date de 463 pacienți cu dozări BCHE cel puțin anual nivelul BCHE în vederea obținerii unor curbe de evoluție de-a lungul timpului.

Pentru pacienții din fiecare clasă CTP dozările pseudocolinesterazei au o tendință descrescătoare. Astfel pentru clasa Child A valoare medie a BCHE este  $8748 \pm 2195$ , pentru Child B  $4997 \pm 1481$  iar pentru Child C  $2675 \pm 1372$  (Tabel 3). Această scădere progresivă a valorii BCHE sugerează că nivelul BCHE se poate corela cu gravitatea hepatopatiei și pare să fie în concordanță cu studiile anterioare.

## Statistică descriptivă

	BCHE		
	A	B	C
Valid	356	63	44
Missing	0	0	0
Mean	8748.11	4997.00	2675.23
Std. Deviation	2195.84	1481.50	1372.16
Minimum	3220.00	2054.00	980.00
Maximum	21197.00	9847.00	8416.00

Tabel 3 Valorile pseudocolinesterazei (BCHE) pentru stadiile CTP

## 7. Studiul 1- Corelații între valoarea pseudocolinesterazei serice și scorurile Child-Pugh și MELD-Na

### 7.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)

Pentru a determina gradul de insuficiență hepatică la pacienții cirofici folosim teste funcționale hepatice. Aceste teste pot fi influențate și de alte afecțiuni. În contrast cu aceste teste, pseudocolinesteraza serică are valori serice scăzute în insuficiența hepatică.

Rolul acestui studiu este de a stabili dacă există o corelație între nivelul BCHE și nivelul insuficienței hepatice.

Proteinele sintetizate de către ficat sunt reprezentate de către ceruloplasmină, albumină serică, alfa1-antitripsină, feritină, lipoproteine și factori de coagulare. Aceste proteine sunt sintetizate de către ficat dar nivelurile serice pot fi influențate de alte patologii. Pseudocolinesteraza serică este de asemenea sintetizată de către ficat și apoi eliberată în fluxul sangvin (5).

### 7.2 Pacienți și Metoda

**Pacienți.** Am selectat 70 de pacienți (28 bărbați și 42 femei) internați în Institutul Clinic Fundeni, București, România, între 2017 și 2018 și au fost incluși în studiu. Criteriile de includere au fost: diagnostic de ciroză hepatică (bazat pe examen clinic sau ultrasonografie abdominală sau elastografie sau date histologice). Criteriile de excludere au fost tratamente recente cu transfuzii de sânge sau plasmă în ultima lună înainte de înrolare, suspiciunea clinică de sângerare variceală recentă, diagnostic cunoscut de hepatocarcinom sau istoric personal de transplant hepatic. Am obținut consimțământ informat.

**Măsurarea markerilor serici.** Probele de sânge au fost prelevate cu minimă stază. Serul a fost obținut prin centrifugarea în maximum o oră de la recoltare. Albumina serică, bilirubină totală, creatinina serică, Na seric, ALAT, INR și hemoleucograma completă au

fost efectuate. Activitatea colinesterazei serice a fost determinată printr-o metodă chemoluminescentă cu un analizor Cobas e601 Roche în 2 ore de la centrifugarea probei..

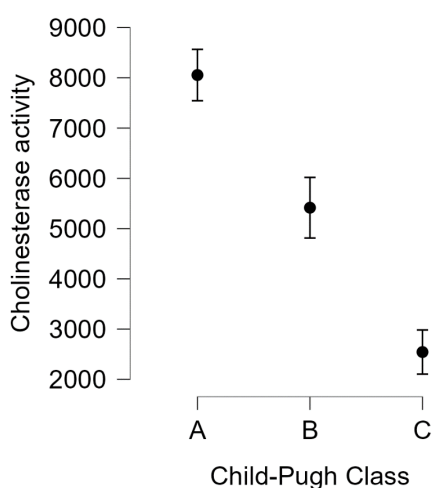
**Analiza statistică.** Analiza statistică și managementul bazei de date a fost efectuat utilizând JASP 0.16.3 Software for Windows11. Rezultatele descriptive au fost prezentate ca și medie  $\pm$  deviație standard (SD) sau număr (procentaj) de pacienți. Am folosit multiple comparații pentru testul ANOVA și au fost comparate cu media datelor. Am aplicat The Pearson correction test pentru compararea colinesterazei serice , albuminei serice și timpul de protrombină (INR). Testele au fost bidirecționale și s-a considerat că  $P < 0,05$  indică o diferență semnificativă statistic

### 7.3 Rezultate

**Caracteristicile pacienților.** Un total de 70 de pacienți cu vârsta medie de  $66.47 \pm 10.41$  ani au fost selectați. 28 de pacienți au fost bărbați cu vârsta medie de  $63,64 \pm 12,74$  ani și 42 de pacienți au fost femei cu vârsta medie de  $68.35 \pm 8,15$  ani.

În Child-Pugh clasă A au fost 43 patients (61,42%), în clasă B 13 patients (18,57%) și în clasa C 14 patients (20%) (Table 9).

**Pseudocolinesteraza serică în grupele Child-Pugh.** Rezultatele au indicat că nivelul BCHE tind să scadă semnificativ la trecerea de la un grad la altul: Child A ( $8055.465 \pm 1709.092$  U/l), Child B ( $5415.769 \pm 1109.270$  U/l) și Child C ( $2543.643 \pm 838.512$  U/l) (Table 4). Diferența dintre media BCHE în grupurile Child A, B și C a fost semnificativă statistic, ca și diferența dintre valorile mediilor pentru grupurilor Child B și C (Figura 4).



Figură 4 Activitate pseudocolinesterază



**Corelații între colinesteraza serică, albumină și INR.** Colinesteraza serică se corelează pozitiv cu albumina ( $r=0.633$ ,  $P<0.001$ ) și se corelează negativ cu INR ( $r=-0.404$ ,  $P<0.001$ ) în cazul acestor pacienți. Acest aspect confirmă că aceste substanțe au fost sintetizate de către ficat iar scăderea lor în ser în cazul insuficienței hepatice confirmă scăderea sintezei hepatice. Colinesteraza și INR ( $r=-0.404$ ,  $p=0.001$ ) au o corelație negativă puternică. Albumina și INR ( $r=0.782$ ,  $p=0.001$ ) au o corelație pozitivă puternică.

**Corelații între pseudocolinesteraza serică, scorul Child-Pugh și scorul MELD-Na.** Pseudocolinesteraza serică și scorul Child-Pugh au o corelație negativă, puternică ( $r=-0.696$ ,  $p=0.001$ ). Pseudocolinesteraza și scorul MELD-Na ( $r=-0.548$ ,  $p=0.001$ ) au aceeași corelație negativă, puternică. Între scorul Child-Pugh și scorul MELD-Na ( $r=-0.783$ ,  $p=0.001$ ) există o corelație pozitivă puternică ce validează datele .

**Pseudocolinesteraza serică grupată conform scorului Child-Pugh pentru pacienții cu virus hepatic C.** Am selectat 52 de pacienți cu infecție cu virus hepatic C și i-am împărțit în grupuri A, B și C, conform scorului Child-Pugh. Rezultatele indică ca nivelul colinesterazei serice are o tendință de descreștere semnificativă în cele 3 grupuri: Child A ( $8237.541\pm 1572.758$  U/l), Child B ( $5390.111\pm 1167.291$  U/l) și Child C ( $2702.667\pm 1011.552$  U/l) (Tabel 14), similar cu rezultatele din grupul întreg. Diferența dintre media activității colinesterazei serice în grupurile Child A, B and C a fost semnificativă statistic, ca și diferența dintre valorile medii ale grupurilor Child B și C. Valorile sun similare cu valorile obținute pentru întregul grup.

#### 7.4 Discuție

În grupul Child A, valoarea colinesterazei serice a fost  $8055.46$  U/l cu o SD de  $1709.09$  U/l, în grupul Child B valoarea medie a colinesterazei serice a fost  $5415.76$  U/l cu o SD de  $1109.27$  iar în grupul Child C valoarea medie a colinesterazei serice a fost  $2543.64$  U/l cu o SD de  $838.51$  U/l. Rezultatele obținute sunt similare cu datele publicate de Gu și Zhong (26). Datele lor au arătat ca nivelurile colinesterazei serice pentru fiecare grup Child/Pugh au fost: Child A ( $5978\pm 535$  U/l), Child B ( $3957\pm 454$  U/l) și Child C ( $2267\pm 332$  U/l). Scorul Child-Pugh este calculat din cinci parametri clinici caracteristici ai bolii hepatice. Doi parametri, ascita și encefalopatia, au un caracter subiectiv (118). Ciroza hepatică este stratificată în 3 clase Child-Pugh A, B și C, utilizând scorul menționat anterior. Colinesteraza serică comparată cu scorul Child -Pugh, are avantajul că este mai ușor de obținut ( este un singur test biochimic serologic), mai obiectiv în evaluarea rezervei funcționale hepatice și are un cost foarte mic.

Sinteza proteică este efectuată eminent de către ficat. Colinesteraza serică, alumina serică și factorii de coagulare sunt sintetizați de către ficat și apoi eliberați de către acesta în fluxul sanguin. Astfel, testele funcționale hepatice ce includ albumina, colinesteraza și timpul de protrombină (INR) sau dovedit utile în estimarea rezervei funcționale hepatice la un pacient cu ciroza hepatică. Colinesteraza serică se corelează pozitiv cu albumina și negativ cu INR, confirmând astfel faptul că aceste proteine sunt produse de către ficat și reduse în disfuncția hepatică secundar sintezei proteice diminuate.

În cazul pacienților cu boală hepatică decompensată (Grade B and C of Child-Pugh score), albumina și transfuziile sanguine sunt utilizate ca și tratament standard, ceea ce poate să modifice valorile sanguine ale acestor parametri utilizați pentru calculul scorului Child-Pugh score (46). Dacă este necesară o intervenție chirurgicală, riscul calculat cu scorul Child-Pugh poate fi incorect în cazul pacienților tratați cu transfuzii de albumină sau plasmă sau factori de coagulare. (119). În studiul lor, Gu și Zhong (26) au demonstrat că trei pacienți cirofici (doi cu Child B și unul cu Child A) au dezvoltat encefalopatie după intervenția chirurgicală de deconectare porto-azygos, cu niveluri ale colinesterazei sub 2000U/l. (33) Astfel, acești autori au sugerat că pacienții cirofici cu valoarea colinesterazei <2000U/l pot avea un risc ridicat de insuficiență hepatică, dacă necesită intervenții chirurgicale.

Astfel, combinația dintre scorul Child-Pugh nivelul colinesterazei serice poate fi mai obiectivă și mai corectă în evaluarea rezervei funcționale hepatice a pacienților cirofici și poate fi utilă pentru chirurghi în decizia de temporizare a intervenției chirurgicale sau pentru gastroenterologi în ajustarea în consecință a intensității tratamentelor hepatice.

## 7.5 Concluzii

Studiul nostru demonstrează că severitatea disfuncției celulelor hepatice se corelează cu valoarea BCHE și poate estima rezerva funcțională hepatică a pacienților cirofici. Comparată cu scorurile actuale (scorul Child-Pugh și scorul MELD-Na), colinesteraza serică este un test mai puțin complex, mai ieftin, mai ușor de obținut, disponibil în toate unitățile de primiri urgente și nu este influențat de tratamentele pentru boala hepatică decompensată. Combinația dintre colinesterază și scorul Child-Pugh sau scorul MELD-Na poate fi mai obiectivă și mai sensibilă în evaluarea rezervei funcționale hepatice în cazul pacienților cirofici, însă sunt necesare mai multe studii.

## 8. Studiul 2 - Variația nivelului pseudocolinesterazei colinesterazei serice în cursul tratamentului cu antivirale directe pentru hepatita cronică cu virus C

### 8.1 Introducere

Introducerea noilor tratamente pentru infecția cronică cu virus hepatic C ne aduce într-o situație nouă în care multe variabile sunt deocamdată necunoscute. În România sunt tratați mii de pacienți cu infecție cronică cu virus hepatic C cu noile tratamente.

Pe un lot de 50 de pacienți am dozat valoarea BCHE înainte de inițierea tratamentului DAA și la sfârșitul tratamentului cu DAA. Toți pacienții au avut viremie nedetectabilă la finalul tratamentului.

### 8.2 Pacienți și metode

**Pacienți.** În total, 50 de pacienți cu hepatită cronică cu virus C internați în secția Medicina internă 2 a Institutului Clinic Fundeni București, România, în perioada Iun 2017- Iun2018. Criteriile de includere au fost stabilite de Casa Națională de Sănătate pentru programul de tratament al hepatitei cronice cu virus C. Astfel au fost incluși pacienții cu viremie pozitivă, scor Child-Pugh A, Fibromax F3 sau F4, fără istoric de neoplazii hepatice, fără hepatită VHB sau HIV. Criteriile de excludere au fost boala hepatică decompensată și prezența neoplaziilor.

**Măsurarea markerilor serici.** Probele de sânge au fost colectate cu minimă venostază. Serul a fost obținut prin centrifugarea vacutainerelor în maximum 60min de la recoltare. Butirilcolinesteraza serică, ARN-VHC și Fibromax au fost dozate în laborator extern agreat CNAS – Regina Maria București .

**Analiza statistică.** Managementul bazei de date și analiza statistică au fost efectuate utilizând programul SPSS ver.23, Chicago, USA. Rezultatele descriptive au fost exprimate ca medie ± deviație standard (SD) sau ca număr sau procentaj.

### 8.3 Rezultate

Caracteristicile pacienților.

Eșantionul este format din 50 de pacienți, 13 bărbați și 37 de femei , vârsta medie de  $62,5 \pm 8,48$  ani cunoscuți cu hepatită cronică cu virus C..

După includere pacienții au fost tratați cu ombitasvir, paritaprevir, ritonavir și dasabuvir pentru 12 săptămâni. La sfârșitul celor 12 săptămâni au fost reevaluați clinic, ecografic și biologic. Toți pacienții au avut viremie ARN-VHC nedetectabilă la sfârșitul tratamentului și la 12 săptămâni de la finalizarea tratamentului fiind încadrați ca răspuns viral susținut. Colinesteraza serică a avut o valoare medie de  $7304 \pm 2223,37$  U/l înainte de tratament și, după 12 săptămâni de tratament, are o valoare medie de  $6792 \pm 2063$  U/l iar

transaminazele au o evoluție favorabilă înregistrând o scădere în cazul ASAT de la 76UI/l la 24,63ui/l iar ALAT de la 62ui/l la 24,6UI/l, ambele valori încadrându-se în valori fiziologice după tratament. În cazul bilirubinei totale, creatininei serice, albuminei serice, timpului de protrombină, și sodiului seric valorile sunt staționare. Viremia ARN-VHC a scăzut de la o medie de 1095696UI la nedetectabil.

#### 8.4 Concluzii.

Rezultatele studiului au arătat o ușoară scădere a valorii medii a colinesterazei serice după tratamentul cu antivirale cu acțiune directă de la 7304 U/l la 6792 U/l. Ambele valori se încadrează în estimarea făcută de Gu și Zhong pentru stadiul Child A de  $5368.04 \pm 1657.32$  U/l (YB, 2010).

Atât valoarea inițială a BCHE, cât și valoarea medie obținută după confirmarea răspunsului viral susținut arată o menținere a scorului Child-Pugh în stadiul A. Nu am identificat nici o creștere a nivelului BCHE și nici o scădere semnificativă a acesteia după confirmarea obținerii răspunsului viral susținut secundar tratamentului infecției cronice cu virus hepatic C cu antivirale cu acțiune directă.

Având în vedere că a fost demonstrat anterior că nivelul BCHE se corelează cu rezerva funcțională hepatică, practic cu masa de hepatocite funcționale, putem afirma că nu există variații ale acesteia după eliminarea virusului hepatic C din hepatocite.

Această lipsă a variației nivelului BCHE infirmă ipoteza unei îmbunătățiri a rezervei funcționale a ficatului după eliminarea infecției cu virus hepatic C. Este necesară monitorizarea pe termen lung a acestor pacienți.

Ceilalți parametri monitorizați indică un beneficiu doar în cazul transaminazelor ce se normalizează, restul parametrilor având o evoluție staționară.

Astfel se observă oprirea procesului de hepatocitoliză în urma eliminării virusului C hepatic.

### 9. Studiul 3 - Prezentare de caz Variația Pseudocolinesterazei serice înainte și după transplantul hepatic

#### 9.1 Introducere

Transplantul hepatic este ultima opțiune terapeutică pentru pacienții cu boală hepatică terminală. În cazul transplantului hepatic, o creștere a nivelului activității colinesterazei serice poate confirma valoarea clinică a acestei analize.

Am urmărit un pacient internat în Institutul Clinic Fundeni, secția Medicină internă  
2. Acest pacient cu ciroză toxic-nutrițională Child C a primit un transplant cu ficat întreg

de la un pacient decedat. Am obținut consimțământul informat și am efectuat examenul clinic, ultrasonografie abdominală, teste de laborator și dozarea colinesterazei serice în secția noastră. Transplantul hepatic a fost efectuat tot în spitalul nostru. Am obținut probe de sânge pentru testele de laborator înainte și după transplantul hepatic. Postprocedural am urmărit pacientul timp de cinci ani și am repetat analizele de sânge și colinesteraza serică.

## 9.2 Prezentarea cazului

Am selectat un pacient bărbat cu boala hepatică terminală de etiologie toxic-nutrițională ce a primit un transplant hepatic întreg de la un donator decedat. Pacientul avea vârsta de 60 de ani la momentul transplantului. Examenul fizic a identificat icter sclerotegegmentar, ficat de consistență cirotică, splenomegalie și encefalopatie gradul 3. Testele de sânge au identificat anemie moderată și trombocitopenie, prelungirea timpilor testelor de coagulare, albumină serică scăzută, ușoară hepatocitoliză și scorurile Child-Pugh și MELD-Na cu valori compatibile cu insuficiență hepatică severă. Toți parametri indicau boală hepatică terminală și indicația urgentă de transplant hepatic. Valoarea colinesterazei serice înainte de transplant a fost foarte scăzută, cu o valoare de 2700 U/L (Tabel 4).

Parameter	Before liver transplant	After liver transplant
Age (years)	60,00	65,00
Cholinesterase BCHE (U/L)	2700,00	7634,00
Hb (g/dL)	10,10	14,50
Leu ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	4,60	4,58
Plt ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	51,00	90,00
AP (%)	36,00	69,00
INR	2,14	1,28
Fibrinogen (mg/dL)	194,00	351,00
Albumin (g/L)	2,40	4,49
ALAT (U/L)	63,00	47,00
ASAT (U/L)	105,00	40,00
Total Bilirubin (mg/dL)	10,10	0,90
Direct bilirubin (mg/dL)	9,30	0,30
GGT (U/L)	36,00	7,00
FA (U/L)	141,00	52,90
Creatinine (mg/dL)	1,27	1,25
Na serum (mmol/L)	133,00	145,91

Encefalopatya grade	3,00	0,00
Ascites ( ultrasound)	Absent	absent
Child-Pugh score	12 pts ( Child C)	5 pts ( Child A)
Meld-Na Score	28 pts	11 pts

Tabel 4 Caracteristicile pacientului

Transplantul hepatic a fost efectuat și pacientul a supraviețuit intervenției chirurgicale. Am monitorizat pacientul și după cinci ani a fost reevaluat folosind aceleași proceduri (Tabel 4).

### 9.3 Discuție

Transplantul hepatic a avut un efect pozitiv asupra funcției hepatice și asupra nivelului BCHE. Scorul Child-Pugh a scăzut de la 12 pct. (Child C class) la 5 pct. (clasa Child A) iar scorul MELD-Na a scăzut de la 28 pct. la 11 pct. Aceste scoruri au arătat că funcția hepatică a devenit normală după transplant (Tabel 4).

Pseudocolinesteraza serică a crescut de la 2700 U/L la 7634 U/L și astfel valoarea colinesterazei serice (BCHE) după transplantul hepatic este în zona normalului.

Această evoluție a scorurilor este în concordanță cu ipoteza că transplantul hepatic va crește valoarea colinesterazei serice. De asemenea am observat îmbunătățiri și în cazul albuminei serice, INR, activitatea protrombinei, hemoglobinei, fibrinogenului, transaminazelor, bilirubinei totale și a nivelului Na seric.

Normalizarea rezervei funcționale hepatice a determinat îmbunătățirea tuturor acestor parametri.

### 9.4 Concluzie

Acest studiu demonstrează valoarea creșterii activității colinesterazei serice după transplantul hepatic. Îmbunătățirile scorurilor Child-Pugh și Meld-Na confirmă faptul că rezerva funcțională hepatică a crescut după transplantul hepatic.

Noul ficat este responsabil de creșterea rezervei funcționale hepatice. Pseudocolinesteraza serică poate fi un instrument util în evaluarea rezervei funcționale hepatice înainte și după transplantul hepatic.

## 10. Studiul 4 : Relația dintre pseudocolinesteraza serica si supraviețuire

### 10.1 Introducere

De-a lungul vieții unui pacient cirotic nivelul BCHE are o evoluție descendentă. Nivelurile sunt mari la pacienții cu funcție hepatică normală. Cu trecerea timpului valoarea BCHE scade progresiv pe măsură ce pacientul devine cirotic în stadiul Child-Pugh A, apoi Child-Pugh B apoi Child Pugh C. Așa cum am arătat anterior, dacă valoarea BCHE scade

sub 2000ui , riscul de deces perioperator este extrem de ridicat. În plus pacienții cu o valoare mai mică de 6000ui au un risc mult mai mare de deces față de cei cu o valoare peste 6000ui.

Contemplând aceste date se poate pune următoare întrebare: valoarea BCHE este predictivă asupra speranței de viață a unui pacient cirotic?

Dacă da, atunci valoarea BCHE ar putea fi extrem de utilă ca element prognostic al supraviețuirii generale a unui pacient cirotic și nu numai pentru estimarea mortalității perioperatorii.

O valoare a BCHE ar putea încadra pacientul într-o curbă de evoluție așteptată, normală sau anormală. O degradare mai rapidă sau mai lentă a valorilor pseudocolinesterazei ar putea aduce informații suplimentare.

## 10.2 Pacienți și metodă

Am selectat pentru studiul de față 405 pacienți cu un total de 1188 dozări ale butirilcolinesterazei (BChE). Caracteristicile demografice și clinice ale pacienților la înrolare includ vârsta, sexul, etiologia bolii hepatice și gradul de fibroza hepatică. Un sumar al acestor caracteristici este prezentat în Tabelul 5.

Caracteristicile pacienților la înrolare	N = 405 <sup>1</sup>
<b>Vârsta</b>	60 (51, 67)
<b>Sex (masculin)</b>	156 (39%)
<b>Etiologie<sup>2</sup></b>	
TN	35 (8.6%)
VHB	90 (22%)
VHC	280 (69%)
<b>Clasificare Child-Pugh</b>	
Clasa A	307 (76%)
Clasa B	57 (14%)
Clasa C	41 (10%)
<b>Gradul de fibroza</b>	
F0-1	105 (26%)
F2	100 (25%)
F3	142 (35%)
F4	58 (14%)

<sup>1</sup>Statisticile raportate: Mediana (IQR); n (%)

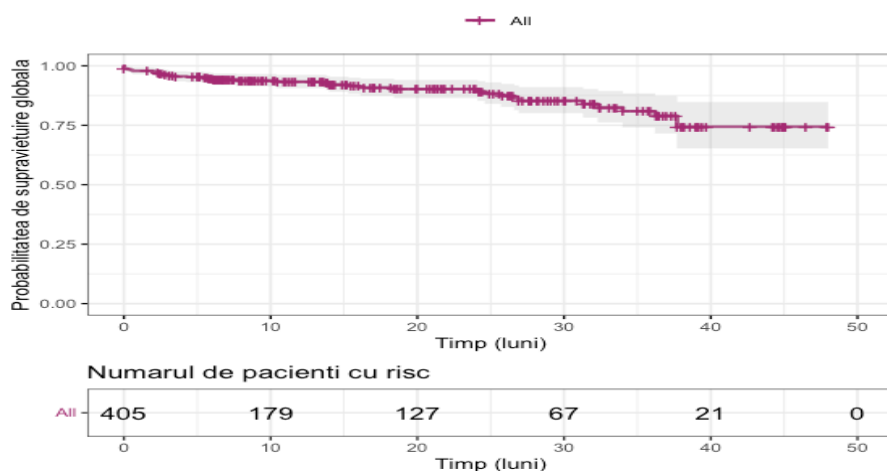
<sup>2</sup>Abrevieri: TN, toxic-nutrițional (alcoolic); VHB, hepatita cronică cu virus B; VHC, hepatita cronică cu virus C.

Tabel 5 Caracteristicile pacienților la înrolare

În medie, pacienții au avut 2 - 3 dozări ale colinesterazei serice, cu un minim și maxim de [1, 6] dozări. Durata maximă a perioadei de urmărire a fost de 4 ani (48 de luni), la sfârșitul acesteia 367 de pacienți rămânând fără eveniment (adică deces), iar 38 (9,4%) sunt

decedați. Supraviețuirea globală a fost de 74,41% (ÎÎ 95%, 84,77% – 65,31%) la încheierea studiului.

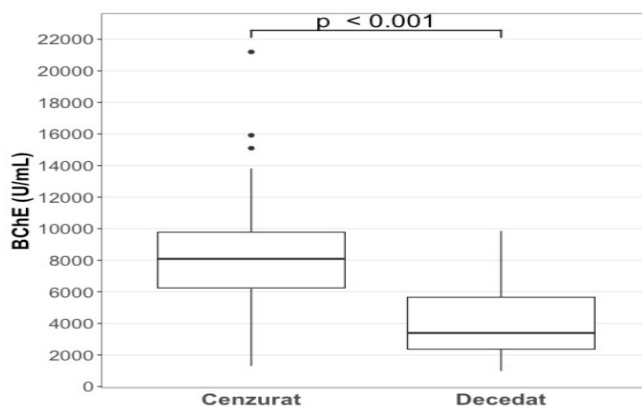
Evoluția Kaplan-Meier a probabilității globale de supraviețuire este ilustrată în



Figural.

Figură 5 Curba Kaplan-Meier de estimare a supraviețuirii globale împreună cu 95% ÎÎ. Abrevieri: ÎÎ, Interval de Încredere.

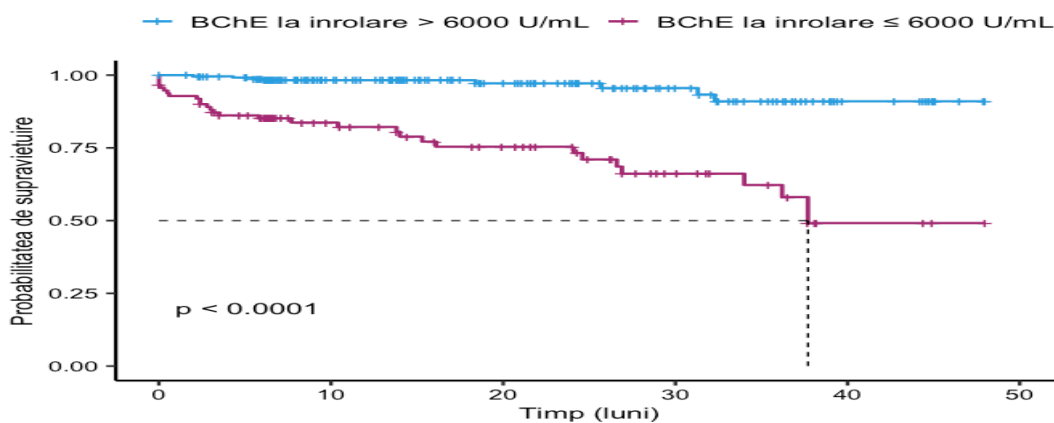
O primă analiză exploratorie a datelor arata că, la momentul înrolării, nivelurile BChE în grupul pacienților decedați sunt semnificativ mai scăzute ( $p < 0,001$ ) decât valorile pacienților din grupul fără eveniment. Figura 6 prezintă distribuțiile biomarkerilor în ambele grupuri împreună cu valoarea  $p$  a diferenței lor statistice, calculată conform testul Mann-Whitney  $U$ .



Figură 6 Nivelurile BChE la înrolare pentru pacienții cenzurați și respectiv, decedați.

În mod similar, probabilitățile de supraviețuire pentru pacienții cu un nivel BChE mai mic de 6000 U/mL la prima dozare sunt semnificativ mai scăzute față de cele ale pacienților cu doze peste nivelul menționat. În figura 22, analiza Kaplan-Meier și testele log-rank arată diferențe semnificative ( $p < 0,0001$ ) între cele 2 curbe de supraviețuire.





Figură 8 Relația dintre nivelul BChE la înrolare și prognosticul de supraviețuire.

Explorarea grafică a traiectoriilor BChE în timp arată că tendințele de evoluție ale markerului la începutul și, posibil, și la sfârșitul perioadei de monitorizare diferă între pacienții cu niveluri BChE la înrolare înalte și cei cu niveluri scăzute. Aceste constatări sugerează faptul că ar putea exista o legătură între dinamica biomarkerului în timp și probabilitatea de supraviețuire a pacienților.

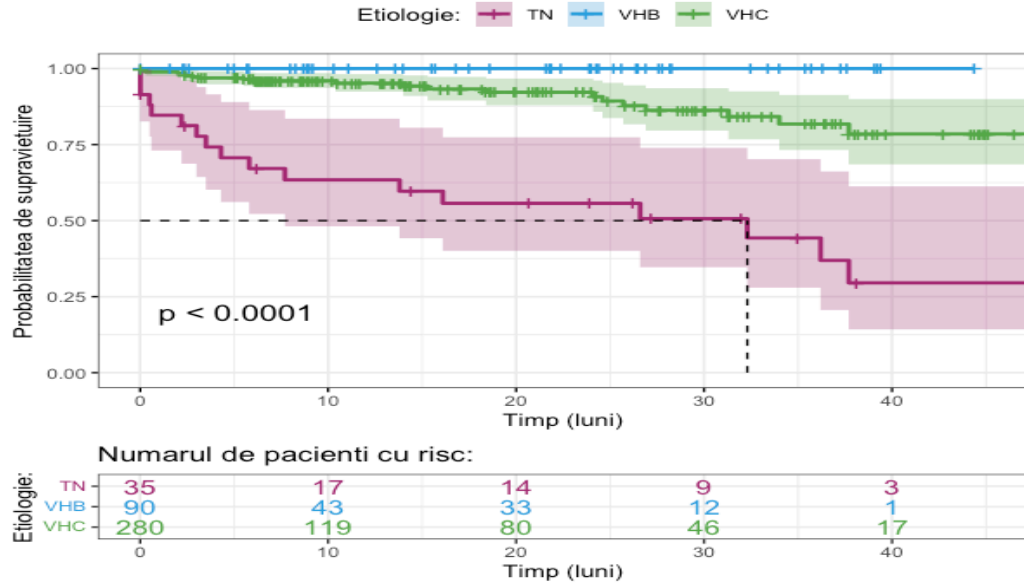
Etiologie	BChE (U/mL)			
	Media	Dev.Std.	Mediana	IQR
TN	4622.11	2674.78	4517.0	3203.00
VHB	9112.04	2834.37	8919.0	2867.00
VHC	7429.50	2620.99	7613.5	3757.25

Tabel 6 Caracteristici ale nivelelor BChE (U/mL) în funcție de etiologia hepatică.

Curbele Kaplan-Meier și testele log-rank demonstrează existența unor diferențe semnificative ( $p < 0,0001$ ) între probabilitățile de supraviețuire ale pacienților cu diferite etiologii hepatice.

Rata de supraviețuire a pacienților din grupul TN a fost de 29,53% (ÎÎ 95%, 14,2% – 61,2%), pentru cei din grupul cu VHC a fost de 78,49% (ÎÎ 95%, 68,5% – 89,9%), iar pentru pacienții cu VHB a fost 100 %.

Timpul mediu de supraviețuire a fost de 32,3 [7,7, - ) luni în grupul TN. Pentru celelalte grupuri, rata de supraviețuire nu a scăzut niciodată sub 50%, prin urmare, timpul mediu de supraviețuire nu poate fi specificat.



Figură 9 Curbele Kaplan-Meier de supraviețuire și ÎÎ 95%, în funcție de etiologia hepatică .

Lucrarea de față își propune să descrie evoluția în timp a biomarkerului BChE în funcție de etiologia bolii hepatice și să studieze asocierea acestuia cu riscul mortalității pacienților.

### 10.3 Rezultate

O analiză a nivelului mediu al BCHE în funcție de vârsta pacienților din studiul acesta, împărțit pe decenii, arată o scădere progresivă. De la o decadă la alta pseudocolinesteraza serică scade în medie cu 629 U/mL / decadă. Iar valoarea medie a BCHE în decada 80-90 ani este de 5591U/mL , apropiată de nivelul de la care s-a observat o mortalitate crescută de 6000U/mL.

Analiza statistică a curbei BCHE arată că scăderea cu o unitate a nivelului  $\sqrt{\text{BChE}}$  crește cu 4% riscul de deces. Revenind la termenii originali ai scalei de măsurare a BChE, vom spune, de exemplu, că așteptăm o creștere cu 4% a riscului de deces la o scădere de aproximativ 80 U/mL a nivelul BChE când acesta este în jur de 1500 U/mL și, respectiv, la o scădere de aproximativ 250 U/mL când nivelul BChE este în jur de 15 000 U/mL.

Lotul studiat cuprinde și 46 de pacienți decedați format din 21 femei cu vârsta medie de 66,43ani și 24 de bărbați cu vârsta medie de 66,83 ani.

Acest lot de pacienți au avut valori medii ale BCHE de 6687,93U/mL pentru cei din grupul Child-Pugh A, 3477,18 U/mL pentru cei din grupul Child-Pugh B și 2634,47U/mL pentru cei Child-Pugh C (tabel).

Tabel 7 - Valoarea medie a pseudocolinesterazei serice a pacienților decedați grupate conform scorului Child-Pugh

	BCHE value		
	A	B	C
Valid	15	11	19
Missing	0	0	0
Mean	6687.93	3477.18	2634.47
Std. Deviation	2472.47	979.69	1228.31
Minimum	2237.00	2054.00	980.00
Maximum	9856.00	5425.00	5398.00

Valorile BCHE se încadrează în tendința de scădere progresivă odată cu scorul Child-Pugh de la A spre C, ca și lotul general.

Dacă se grupează subgrupul pacienților decedați în funcție de gradul de fibroză hepatică obținut prin elastografie Fibroscan se observă că nu este o corelație ideală. Pentru Pacienții cu grad de fibroză hepatică F0-1 valoarea medie a BCHE a fost de 5507,0 U/mL, pentru F2 valoarea BCHE a fost 7225,0U/mL, pentru F3 valoarea BCHE a fost 4720,71U/mL iar pentru cei cu grad mare de fibroză hepatică F4 valoare BCHE a fost 3236,04 U/mL. Există o tendință de scădere a mediei BCHE de la F2 către F4 însă valoarea medie a BCHE la cei cu fibroză F0-1 este mai mică decât a celor cu fibroză hepatică F2. Acest lucru poate fi explicat și de faptul că a fost un singur pacient decedat în grupa de fibroză hepatică F1 sau de faptul că, la pacienții cu stadii incipiente de fibroză, rezerva funcțională hepatică nu se corelează cu fibroza hepatică.

Tabel 8 - Valoarea pseudocolinesterazei serice în funcție de gradul de fibroză hepatică al pacienților cu hepatopatii decedați

	BCHE value			
	F1	F2	F3	F4
Valid	1	5	14	25
Missing	0	0	0	0
Mean	5507.00	7225.00	4720.71	3236.04
Std. Deviation	NaN	3899.35	2427.52	1521.86
Minimum	5507.00	980.00	1197.00	1127.00
Maximum	5507.00	9856.00	9560.00	7319.00

Din observațiile de până în acest moment consider că se poate stabili o clasificare a insuficienței hepatice / rezervei funcționale hepatice , independentă de fibroza hepatică sau de alți parametri, cu 4 stadii de insuficiență hepatică tabel. Stadiul L0 reprezintă pacientul sănătos, cu o funcție hepatică normală și cu o rezervă funcțională normală. Valoarea BCHE în acest stadiu este peste 6000U/mL și este în concordanță cu valorile normale actuale ale BCHE (vezi Tabel 2). În stadiul L1 pacienții au insuficiență hepatică ușoară iar valoarea BCHE este între 4500 și 6000U/mL și corespunde stadiului Child-Pugh A. În stadiul L2 –

insuficiență hepatică moderată , valoarea BCHE este cuprinsă între 2500 și 4499U/mL și corespunde stadiului Child-Pugh B. În stadiul L3 – insuficiență hepatică severă – valoarea pseudocolinesterazei este sub 2500U/mL și corespunde stadiului Child-Pugh C.

Tabel 9 - Propunere Stadii insuficiență hepatică corespunzătoare nivelului pseudocolinesterazei serice

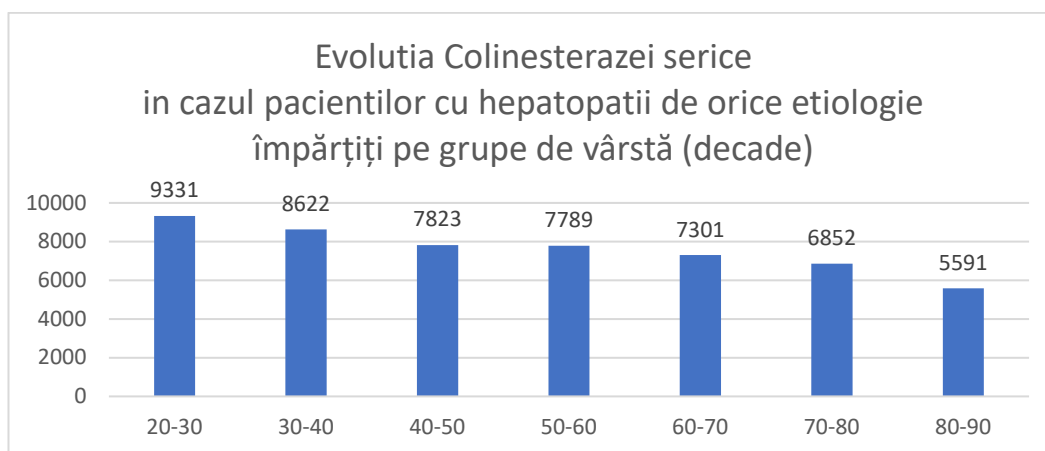
Stadiu	Interpretare	Valoare BCHE
L0	Rezervă funcțională hepatică normală	Peste 6000 U/mL
L1	Rezervă funcțională hepatică scăzută ușor	4500 – 6000 U/mL
L2	Rezervă funcțională hepatică scăzută moderat	2500 – 4499 U/mL
L3	Rezervă funcțională hepatică scăzută sever	Sub 2500 U/mL

	BCHE value			
	L0	L1	L2	L3
Valid	8	9	18	10
Missing	0	0	0	0
Mean	8488.38	5289.89	3137.39	1663.40
Std. Deviation	1470.83	529.44	536.67	551.56
Minimum	6201.00	4595.00	2509.00	980.00
Maximum	9856.00	5904.00	4049.00	2310.00

Tabel 10 Valorile pseudocolinesterazei serice conform stadiilor de insuficiență hepatică L0-L3

Pacienții din grupul studiat, împărțiți în cele 4 grupe de insuficiență hepatică propuse, au o valoare medie a BCHE în scădere progresivă de la L0 spre L3 ce confirmă intervalele propuse în cazul acestui eșantion (Tabel 24). Dacă urmărim valorile medii ale BCHE la pacienții cu hepatopatii cronice grupați pe grupe de vârstă de câte 10 ani putem observa că până la vârsta de 80 ani toți se încadrează în gradul de insuficiență hepatică L0 sau rezervă funcțională hepatică normală.

În decada 0-90 ani valoarea medie a BCHE este de 5591 U/dL ce se încadrează în stadiul L1 – Rezervă funcțională hepatică ușor scăzută (Figura 16).



Figură 9 Valoarea medie a pseudocolinesterazei serice în cazul pacienților cu hepatopatii grupați pe vârste (decenii)

Analizând valoarea BCHE în grupe de scor Child-Pugh alături de zilele supraviețuite de la dozarea BCHE și vârsta decesului grupate în același mod se poate observa că BCHE are valori progresiv mai mici spre grupa Child C. Supraviețuirea medie în zile nu are o distribuție tipică, cea mai scurtă fiind în cazul pacienților Child B iar vârsta la deces a acestor pacienți este similară, în jur de 68 de ani indiferent de grup.

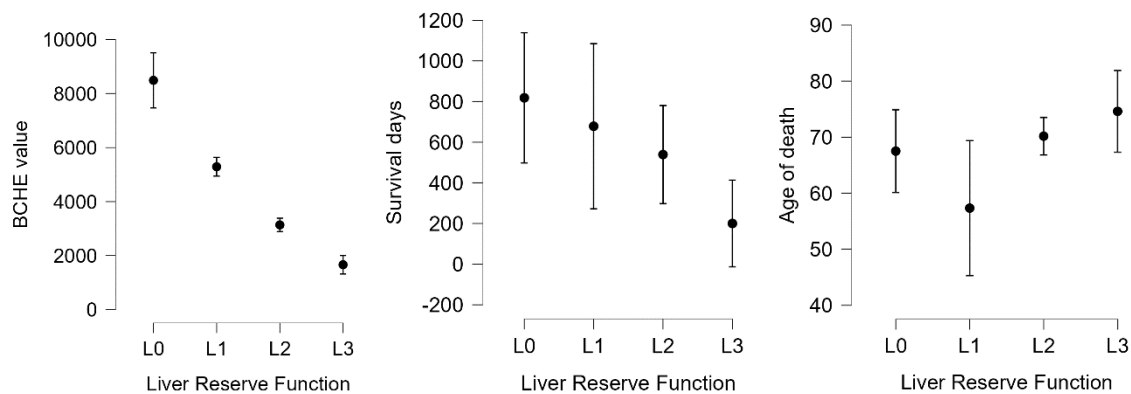
Tabel 11 - Statistică descriptivă BCHE, Supraviețuire și vârsta decesului la subgrupul de pacienți decedați stratificat după clasa Child

	BCHE value			Survival days			Age of death		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Valid	15	11	19	15	11	19	15	11	19
Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	6687.93	3477.18	2634.47	602.40	284.45	641.68	65.87	69.73	68.95
Std. Deviation	2472.47	979.69	1228.31	448.13	375.71	625.28	13.61	10.26	13.78
Minimum	2237.00	2054.00	980.00	61.00	0.00	0.00	28.00	55.00	29.00
Maximum	9856.00	5425.00	5398.00	1496.00	1146.00	1852.00	83.00	87.00	90.00

Descriptive Statistics

	BCHE value				Survival days				Age of death			
	L0	L1	L2	L3	L0	L1	L2	L3	L0	L1	L2	L3
Valid	8	9	18	10	8	9	18	10	8	9	18	10
Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	8488.38	5289.89	3137.39	1663.40	818.25	678.44	539.11	200.10	67.50	57.33	70.17	74.60
Std. Deviation	1470.83	529.44	536.67	551.56	462.52	621.81	522.14	343.37	10.64	18.42	7.23	11.74
Minimum	6201.00	4595.00	2509.00	980.00	130.00	0.00	0.00	0.00	49.00	28.00	62.00	55.00
Maximum	9856.00	5904.00	4049.00	2310.00	1496.00	1852.00	1629.00	1102.00	83.00	78.00	87.00	90.00

Tabel 12 Valoarea BCHEm Supraviețuirea și Vârsta decesului statisticate după insuficiența hepatică



Figură 10 Reprezentarea BChE, supraviețuire și vârsta decesului în funcție de rezerva funcțională hepatică

Un alt factor de risc asociat semnificativ d.p.d.v. statistic cu mortalitatea a fost etiologia bolii hepatice ( $p = 0,0252$ ). Gradul de fibroză hepatică nu a fost găsit ca factor de risc semnificativ pentru decesul pacienților în analiza JM ce include evoluția BChE ca unul dintre predictorii modelului. Însă gradul de fibroză hepatică va rămâne relevant ( $p < 0,0001$ ) în cadrul unui model de supraviețuire care nu include biomarkerul ca factor de risc.

#### 10.4 Concluzii

Gradul de insuficiență hepatică pare facil de estimat cu ajutorul scorurilor actuale însă, în practica zilnică, lucrurile nu sunt foarte clare. Aplicăm Scorurile Child-Pugh și Meld-Na la evaluarea inițială a pacienților cu hepatopatii, la evaluări anuale sau dacă suntem în situația necesității efectuării unei intervenții chirurgicale sau de radiologie intervențională.

Aplicarea acestor scoruri poate aduce informații pertinente asupra prognosticului sau a supraviețuirii pacientului în condițiile unei intervenții chirurgicale sau chemoembolizării a unuia sau mai multor segmente hepatice, montarea unui TIPPS sau chiar a unui transplant hepatic însă nu pot fi aplicate în orice situație și oricărui pacient.

Pacienții anticoagulați, cei ce primesc transfuzii sau albumină parenteral nu pot fi evaluați corect cu aceste scoruri. În plus în stadiul Child-Pugh A pot intra și pacienți ce nu au ciroză hepatică pentru că la calcularea scorului, așa cum am arătat, se folosesc Bilirubina totală, Albumina serică, INR/ul, prezența ascitei și prezența encefalopatiei. Astfel un pacient fără o patologie hepatică semnificativă va primi o clasificare Child-Pugh A. Acest stadiu arată că prognosticul pacientului este foarte bun dacă va trece printr-o intervenție chirurgicală însă va include și pacienți ce poate nu sunt în stadiul de ciroză hepatică.

Dozând activitatea colinesterazei serice se poate diferenția un pacient cu scor Child-Pugh A cu rezervă hepatică normală (stadiul L0) față de un pacient cu scor Child-Pugh A cu insuficiență hepatică ușoară (stadiul L1).

## 11. Concluzii și contribuții personale

Pseudocolinesteraza serică este o enzimă plasmatică fără un rol bine stabilit până în acest moment. Este responsabilă de degradarea rapidă a anestezicelor. Este o proteină sintetizată de către hepatocit și apoi excretată în plasmă. Nivelul plasmatic al acestei enzime nu este influențat de tratamente și astfel poate fi utilizat în evaluarea funcției hepatice de sinteză proteică.

Funcția hepatică de sinteză a proteinelor este utilă în estimarea rezervei funcționale hepatice. Practic rezerva funcțională hepatică reprezintă capacitatea organului de a tolera injurii trecătoare, asupra funcției hepatice și ulterior să își recapete capacitatea anterioară de funcționare sau un nivel de funcționare care să permită supraviețuirea pacientului după acest eveniment.

O injurie trecătoare cu ar fi o infecție virală hepatică sau un episod de ALF este de așteptat să fie urmat de o recuperare a rezervei funcționale hepatice însă o procedură ce îndepărtează chirurgical sau induce ischemia unei fracții a volumului hepatic induce o diminuare permanentă a rezervei funcționale hepatice.

Cunoașterea nivelului rezervei funcționale hepatice ne ajută să estimăm, să facem predicții asupra evoluției pacientului după efectuarea unei intervenții chirurgicale, radiologice sau după un tratament medicamentos și a speranței de viață.

Așa cum am arătat, nivelul BCHE scade pe măsură ce boala hepatică evoluează și se corelează cu stadiile scorului Child-Pugh și Meld-Na. Practic poate fi folosită în locul acestor teste pentru evaluarea rezervei hepatice.

Corelarea nivelului BCHE cu funcția hepatică este dovedită și prin creșterea până la normalizare la primitorul unui transplant hepatic de la un pacient decedat. Normalizarea BCHE arată că funcția de sinteză proteică a ficatului unui pacient clasificat inițial în clasa Child-Pugh C devine clasa Child-Pugh A după transplantul hepatic.

Pentru că pseudocolinesteraza serică nu poate evalua gradul de fibroză hepatică ar putea fi benefică elaborarea unui scor care să conțină doar 2 parametri: pseudocolinesteraza serică și evaluarea fibrozei prin elastografie.

Datorită faptului că pseudocolinesteraza serică poate evalua funcția de sinteză proteică a ficatului și implicit rezerva funcțională hepatică poate fi utilizată în evaluarea

de-a lungul timpului a acestui parametru. Astfel am folosit-o pentru a cerceta evoluția rezervei funcționale hepatice în cazul pacienților infectați cu virusul hepatic C înainte, în timpul și după tratamentul cu antivirale cu acțiune directă. Dozările BCHE au urmărit rezerva funcțională hepatică a acestor pacienți înainte și după obținerea răspunsului viral susținut. Concluzia acestui studiu a fost că eliminarea virusului hepatic C la pacienții cu hepatita cronică virală nu induce o creștere a rezervei funcționale hepatice.

Astfel, rezerva funcțională hepatică a pacienților cu hepatita cronică C nu era inhibată temporar de prezența virusului. Virusul hepatic C scade rezerva funcțională hepatică în timp prin hepatocitoliză cronică și implicit prin scăderea progresivă a masei de hepatocite. Eliminarea virusului hepatic C nu induce, cel puțin în anii următori o ameliorare a funcției hepatice.

Toate aceste informații au confirmat ipoteza că pseudocolinesteraza serică poate avea proprietăți predictive asupra supraviețuirii pacienților cu hepatopatii. Am analizat supraviețuirea medie a unui lot de pacienți cu hepatopatii ce au decedat și am încercat să aflăm durata medie de supraviețuire. În primul rând valoarea colinesterazei serice de la care se poate spune că riscul de deces este mare s-a dovedit a fi 6000ui. Valoarea critică a pseudocolinesterazei este de 2500ui, de la această valoare supraviețuirea este posibilă doar cu tratamente medicale susținute sau transplant hepatic. Aceste valori pot fi extrem de utile în deciziile medico-chirurgicale pentru pacienții cu hepatopatii cronice.

Analizând nivelurile medii anuale ale pseudocolinesterazei am obținut curbe de scădere a pseudocolinesterazei de-a lungul vieții unui pacient cu hepatopatie cronică. Analiza acestor curbe poate să aducă informații privind evoluția naturală a bolii, evaluarea intervențiilor terapeutice din punct de vedere al influenței benefice sau nefavorabile asupra curbelor de evoluție. Aceste noi teme de cercetare ar putea confirma sau infirma efectul terapeutic al unor medicamente sau suplimente cu potențial terapeutic asupra hepatopatiilor.

Pseudocolinesteraza serică , în lumina dată de aceste studii, poate fi utilă în estimarea funcției hepatice însă sunt necesare studii pe eșantioane mai mari de pacienți pentru a putea fi validată.



## 12. Lista lucrărilor științifice publicate

Art.1 Stancu G, Iliescu EL. The Influence of Liver Transplant on Serum Cholinesterase Levels: A Case Report. *Cureus*. 2023 Jan 14;15(1):e33761. doi: 10.7759/cureus.33761. PMID: 36793850; PMCID: PMC9923630. ( Se regăsește în capitolul 9)

Art.2 Stancu G, Sorohan B, Gherlan G, Toma L, Iliescu LE. Correlations between the value of serum cholinesterase and Child-Pugh and Meld-Na scores in cirrhotic patients. *Ro J Infect Dis*. 2022;25(2):62-6. doi:10.37897/RJID.2022.2.5 ( Se regăsește în capitolul 7)

## Bibliografie selectivă

1. *Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis*. . Moon AM, Singal AG, Tapper EB. s.l. : Clin Gastroenterol Hepatol. , 2020 Nov;, Vol. 18(12):2650-2666. . doi: 10.1016/j.cgh.2019.07.060. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31401364; PMCID: PMC7007353..
2. *European Association for the Study of the Liver EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis*. . 53:3–22. , s.l. : J Hepatol, 2010. doi:10.1016/j.jhep.2010.03.001.
4. M., Torbenson. *Biopsy interpretation of the liver*. . s.l. : Wolters Kluwer Health,, 2014.
7. *The aminopyrine breath test as a measure of liver function . A quantitative description of its metabolic basis in normal subjects*. Irving CS, Schoeller DA, Nakamura KI, Baker AL, Klein. s.l. : J Lab Clin Med , 1983, Vol. 100:356-373,.
8. *Hepatic Uptake of the Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Gd-EOB-DTPA: Role of Human Organic Anion Transporters*. . Leonhardt M, Keiser M, Oswald S, Kühn J, Jia J, Grube M, et al. s.l. : Drug Metabol Dispos., 2010, Vol. 38:1024–8. . doi: 10.1124/dmd.110.032862.
9. *Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis*. Guadalupe Garcia-Tsao, Scott Friedman, John Iredale, Massimo Pinzani. 4, s.l. : Hepatology , 2010, Vol. 51. 10.1002/hep.23478.
11. *[Place of serum cholinesterase in the diagnosis of chronic liver diseases]*. . Dimov DM, Iordanova IU, Donchev P. 14(4):40-6. Bulgarian. P, s.l. : Vutr Boles. , 1975.
12. B, McArdle. The serum cholinesterase in jaundice and diseases of the liver. s.l. : Quart J Med, 1940, p. 107.
15. *Butyrylcholinesterase as a biochemical marker*. . M., Pohanka. 12:726-34. , Bratislava : Bratisl Lek Listy. , 2013, Vol. 114. doi: 10.4149/bll\_2013\_153. PMID: 24329513..  
World J Gastroenterol. , 2020, Vol. 7. doi: 10.3748/wjg.v26.i45.7088. PMID: 3336.
44. Gu YJ, Zhong YB. Cholinesterase determination of evaluation of patients with liver cirrhosis of the liver reserves significance. s.l. : Chin J Med Guide, 2010, pg. 649-650.*ardperfusion*. . Wipper, Sabine. Munchen : Dissertation, LMU München: Faculty of Medicine , (2006): .
81. *Synthesis and radiolabeling of galactosyl human serum albumin*. . Kudo M., Washino K., Yamamichi Y., Ikekubo K. :383–94. [PubMed], s.l. : Methods Enzymol., 1994, Vol. 247.