

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

UNIVERZITA PALACKÉHO

II. interní klinika gastroenterologická a hepatologická

Přednosta doc. MUDr. Vlastimil Procházka, Ph.D.

Možnosti neinvazivního vyšetření jaterní fibrózy

u pacientů s chronickou hepatitidou C

Disertační práce doktorandského studia

MUDr. Květoslava Aiglová

OLOMOUC 2012

Obsah

Seznam zkratk	4
Úvod	6
1. Současný stav problematiky	8
1.1 Definice jaterní fibrózy	8
1.2 Fibrogeneze	9
1.2.1 Speciální buňky jaterní fibrogeneze	9
1.2.2 Extracelulární matrix	11
1.3 Fibrolýza-degradace matrix	11
2. Diagnostika jaterní fibrózy	13
2.1 Histologie	13
2.1.1 Jaterní biopsie a histologické vyšetření vzorku tkáně	13
2.1.2 Přínos histopatologického vyšetření	15
2.1.3 Battsova-Ludwigova klasifikace chronických hepatitid	15
2.2 Neinvazivní metody diagnostiky jaterní fibrózy	21
2.2.1 Sérové markery jaterní fibrózy-biomarkery	21
2.2.1.1 Sérové markery I.třídy-tzv nerutinní markery	22
2.2.1.2 Sérové markery II. třídy- rutinní markery	28
2.3 Kvantifikace jaterních funkcí-dechové testy	40
2.4 Zobrazovací vyšetřovací metody	41
2.4.1 Ultrasonografie(USG)	41
2.4.2 Měření tuhosti jater	42
2.4.2.1 Fibroscan-transientní elastografie(TE)	42
2.4.2.2 Real Time Elastography(RTE)	45
2.4.2.3 Acoustic Radiation Force Impuls Elastography(ARFIE)	46
2.4.3 Magnetická rezonance(MR)	46
2.4.3.1 Diffusion weighted magnetic resonance imaging (DWI MR)	47
2.4.3.2 MR elastografie (MRE)	47
2.4.3.3 Magnetická spektroskopie(MRS)	48
2.4.4 Počítačová tomografie(CT)	48
3. Vlastní práce	49
3.1 Cíle doktorské disertační práce	49
3.2 Metodika a soubor nemocných	50
3.2.1 Soubor nemocných	50
3.2.2 Metodika	51
3.2.3 Statistické hodnocení	51
3.3. Výsledky	62
3.3.1 Průkaz citlivosti vybraných sérových markerů fibrózy	62
3.3.2 Hodnocení vztahu kouření a stupně jaterní fibrózy	75
3.3.3 Zjištěná fibróza v souboru nemocných s chronickou hepatitidou C	79
3.3.4 Vztah stupně fibrózy k dosažené SVR	80
3.3.5 Vztah mezi stupněm fibrózy, věkem a toxikomanií	81
4. Diskuze	82
5. Závěry, summary	87
6. Závěry pro praxi	93
7. Literatura	94

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli panu prof. MUDr.Jiřímu Ehrmannovi, CSc. Nejenže mi pomáhal při řešení zvoleného tématu dizertační práce, ale především mě před 12 lety k hepatologii přivedl a předal mi spoustu zkušeností z tohoto oboru.

Velký dík patří prof. MUDr.Jiřímu Ehrmannovi,Ph.D. a kolektivu pracovníků Ústavu patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého bez jejichž pomoci při zpracování a hodnocení bioptických vzorků by tato práce nevznikla.

Za statistické zpracování získaných výsledků děkuji paní Mgr.Janě Zapletalové, Ph.D. z Ústavu lékařské biofyziky LF UP.

Rovněž děkuji současnému přednostovi II. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, panu doc. MUDr.Vlastimilu Procházkovi,Ph.D., za odborné zázemí, které studentům doktorského studia vytváří.

Seznam zkratk

A2M	alfa-2-makroglobulin
ADC	apparent diffusion coefficient
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
anti HCV	protilátky proti viru hepatitidy C
apo A1	apolipoprotein A1
ARFIE	acoustic radiation force impuls elastography
AST	aspartátaminotransferáza
BMI	body mass index
CDS	cirrhosis discriminant score
CEUS	kontrastní ultrazvukové vyšetření
CMBT	¹³ C methacetin breath test
CL	kolagen
CT	počítačová tomografie
CTGF	růstový faktor pojiva
CYP 450	cytochrom P 450
ČHS	Česká hepatologická společnost
DWI MR	difusí vážená magnetická rezonance
FPI	fibrosis probability index
GGT	gama glutamyltransferáza
HA	hyaluronová kyselina
HCV	virus hepatitidy C
HIV	virus lidské imunodeficience
HOMA-IR	inzulinová rezistence
HVTT	hepatic vein transit time
HYP	hydroxyprolin
IL	interleukin
INF γ	interferon gama
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
MMP	matrix metaloproteinázy
MnSOD	mangansuperoxid dismutáza

MRE	magnetická rezonanční elastografie
NAFLD	non alcoholic fatty liver disease
NAG	N acetylglucosaminidasa
NANB	non-A non-B hepatitida
NASH	nealkoholická steatohepatitida
PIIINP	N.terminální peptid prokolagenu III
PCHE	pseudocholinesteráza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDE	fosfodiester
PDGF	destičkový růstový faktor
PICP	karboxy-terminální peptid prokolagenu typu I
PLT	trombocyty
PME	fosfomonoester
RTE	real time elastography
RT PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
SPIO	superparamagnetický oxid železa
SVR	setrvalá virologická odpověď
TE	transientní elastografie
TGF β	transformující růstový faktor beta
TGF α	transformující růstový faktor alfa
TIMP	tkáňový inhibitor proteáz
TNF	tumor nekrotizující faktor
USG	ultrasonografie
VHB	virová hepatitida B

Úvod

„Liver fibrosis – from bench to bedside“, tak nazval S.L.Friedman článek v časopisu Journal of Hepatology a charakterizoval tak výzkum jaterní fibrózy v posledních 20 letech (Friedman SL. 2003). Problematika jaterní fibrózy se posunula z čistě laboratorní disciplíny do oblasti klinické hepatologie. Pokrok kulminoval zjištěním, že fibróza a možná i cirhóza mohou být reverzibilní. Dnes je jaterní fibróza chápána jako porucha jinak vyrovnaného procesu jaterní fibrogenese a fibrolýzy. Přestože noxy poškozující játra jsou rozmanitého původu, hepatotropní viry, alkohol, léky, toxiny, autoprotilátky, železo, cholestáza a další, proces fibrogenese je velmi standardní a v podstatě u všech příčin stejný (Bedosa P. 2008). Jednou z hlavních a v souvislosti s jaterní fibrózou nejdéle studovanou noxou je virus hepatitidy C (HCV).

Byl identifikován v roce 1989. Již dříve byla známa skupina hepatitid, označovaná non-A, non-B hepatitida (NANB), posléze však byla u většiny pacientů s touto diagnózou zjištěna HCV infekce.

V současné době je virem hepatitidy C na celém světě infikováno 170 - 200 milionů lidí.

V České republice je prevalence HCV infekce asi 0,2 %. HCV infekce je podle jednotlivých referencí považována za příčinu 44 -88 % chronických hepatitid, 21-67 % jaterních cirhóz a 33-77 % hepatocelulárních karcinomů (Urbánek P. 2004). Riziko HCV infekce spočívá v jejím počátečním asymptomatickém průběhu, akutní infekce není ve většině případů zaznamenána vůbec a chronická hepatitida nemocnému nečiní zpočátku žádné problémy nebo jen potíže nespecifické. Chronická hepatitida může progredovat do jaterní cirhózy. Během 10-20 let vzniká cirhóza u asi u 20 % nemocných chronickou hepatitidou C a hepatocelulární karcinom vzniká ročně u 1-4 % nemocných s jaterní cirhózou. U pacientů bez cirhózy je výskyt rakoviny jater vzácnější. HCV infekce tak představuje velký zdravotní, sociální a ekonomický problém.

Význam přítomnosti jaterní fibrózy u nemocných s chronickou hepatitidou C je především v predikci její progrese a stupeň fibrózy je vztahován k pravděpodobnosti dosažení trvalé virologické odpovědi na léčbu pegylovaným interferonem a ribavirinem (Herrine SK. 2005). U nemocných s minimálním stupněm fibrózy bylo dosaženo setrvalé virologické odpovědi (SVR) v 57 %, u těch s vysokým stupněm fibrózy ve 44 % (Davis 1997, Urbánek P. 2004).

Jaterní fibróza se tak stala „horkým“ tématem hepatologie řešícím tři okruhy otázek. Prvním je oblast základního výzkumu, druhým okruhem otázek je diagnostika jaterní fibrózy a třetí oblastí, zatím jen na samém počátku praktických výstupů je léčba. Předmětem předložené

disertační práce jsou diagnostické metody jaterní fibrózy a vlastní práce se týká serologických diagnostických metod. Při znalosti současného stavu problematiky, tak jak je popsán v úvodní kapitole této disertační práce, by se mohlo zdát, že se jen s obtížemi najde prostor pro rozšíření znalostí a poskytnutí nových poznatků v serologických diagnostických metodách jaterní fibrózy. To je navíc akcentováno tím, že soubor nemocných, na kterém byla tato studie provedena, vznikl poslední 4 roky a za tu dobu bylo publikováno množství nových serologických testů. Nicméně, u nás nebyla publikovaná práce týkající se serologické diagnostiky jaterní fibrózy u nemocných s chronickou hepatitidou C. Navíc jsme testy rozšířili o dosud neužívaný faktor a tím je kouření. V tom vidíme hlavní přínos předložené disertační doktorské práce.

1. Současný stav problematiky

1. 1. Definice jaterní fibrózy

Jaterní fibrózu definujeme jako strukturální změnu jaterní tkáně s nadměrným ukládáním vazivové hmoty, kdy došlo k poruše regulace její syntézy a degradace ve prospěch tvorby. Ve světle nových poznatků je jaterní fibróza a možná i cirhóza reversibilním stavem. V praxi byl již opakovaně prokázán ústup fibrózy, zejména v klinických studiích léčby chronické virové hepatitidy C (Urbánek P. 2004). Avšak „nový objev“ může sice být skutečně novým objevem, ale také přebaleným a upraveným objevem starým. Může se jednat o nadhodnocení dat a konečně vzrušující příběh nemusí být vždy pravdivý (Taimr P.2008). Přesto možnost stabilizovat fibrózu nebo ji zvrátit do regrese je myšlenka velmi lákavá, a v tom je také klíčový význam renesance zájmu o ni. Před necelými 50 lety profesor P. Lukl píše ve své knize Vnitřní lékařství, učebnici, ze které studovaly generace lékařů, o jaterní fibróze pouze toto: „Názvů chronická hepatitida a jaterní cirhóza se často užívá pro označení téže nemoci. Mají sice zmnožené vazivo a zánětlivou reakci, ale u cirhózy je výrazná přestavba parenchymu. Chronická hepatitida v užším slova smyslu nemá specifickou symptomatologii a často probíhá asymptomaticky“ (Lukl P. 1965). Ještě i v dalších letech byl pro klinického lékaře histologický nález jaterní fibrózy vcelku nezajímavým zjištěním, pokud nebyl provázen přestavbou jaterního parenchymu tj. obrazem jaterní cirhózy. Až počátkem 90. let minulého století bylo nezávisle na sobě publikováno několik prací, zdůrazňujících nutnost zavedení nových klasifikačních schémat hodnocení chronických hepatitid respektujících grading (nekrózu/apoptózu a zánětlivou infiltraci) a staging (stupeň fibrózy). Tedy nejen aktivita chronické hepatitidy, histologicky vyjádřená piecemal nekrózami event. lobulárními nekrózami, a laboratorně vyjádřená zvýšenou sérovou aktivitou transamináz, ale také fibróza a její stupeň jsou klíčovými znaky pro další průběh chronické hepatitidy a léčebný úspěch. Aktuálním tématem současné hepatologie je, jak stanovit a hlavně monitorovat stupeň jaterní fibrózy. Francouzský systém histologického hodnocení chronických hepatitid, zejména chronické hepatitidy C, vycházel z výsledků studie METAVIR Cooperative Study Group. Výsledkem je algoritmus aktivity (A0-A3) a algoritmus fibrózy (F0-F4). Byl pak navržen vzorec progrese fibrózy u HCV infekce, kterou podle Poynarda lze vypočítat: METAVIR v jednotkách / trvání HCV infekce v letech = jednotka progrese v letech (Poynard T.1997). Nicméně, monitorování fibrózy jaterní biopsií je klinicky téměř neproveditelné. Proto se tak intenzivně hledají možnosti jiné.

1. 2. Fibrogeneze

Pojivová jaterní tkáň je tvořena dvěma složkami. Mezibuněčnou hmotou (matrix) a speciálními buňkami. Jak již v definici jaterní fibrózy bylo řečeno, akumulace mezibuněčné hmoty vzniká v důsledku zvýšené její syntézy a snížené degradace. Je ale třeba si uvědomit, že fibrogeneze, tj. syntéza mezibuněčné hmoty, je nezbytný hojivý proces a fibrolýza, tj. odstraňování mezibuněčné hmoty vzniká po skončení hojivého procesu. Fibrogeneze a fibrolýza jsou dynamické procesy, indukované působky speciálních buněk, jako odpověď na různá agens. Klíčovou roli mezi speciálními buňkami hrají jaterní hvězdicové buňky. Pokud fibrogeneze převyšuje fibrolýzu, tj. při persistenci etiologického agens, dochází v dalším průběhu nejen k množení pojivové tkáně ,ale i k vaskulárním a nodulárně regenerativním změnám, jejichž kombinace s fibrózou tvoří již obraz jaterní cirhózy.

1.2.1. Speciální buňky jaterní fibrogeneze

Hvězdicovité buňky byly podle svého tvaru poprvé popsány v roce 1966 (Bronfenmajer 1966, Ito 1968). Další jejich synonyma vznikala s poznáváním jejich funkce; hepatic stellate cells, lipocyty, perisinusoidální lipocyty, pericyty, fat-storing cells, vitamin A storing cells (skladují 40-70 % tělesného vitamínu A), portální fibroblasty, Itovy buňky. Nacházejí se v Disseho prostorech, strádají kapénky lipidů a vitamínu A. Jsou schopny přeměny v **myofibroblasty**, které produkují mezibuněčnou hmotu a růstové faktory, které rovněž podporují fibrogenezu (Brenner 2000).

Aktivace spících Itoových buněk spočívá ve stimulaci jejich buněčné proliferace a fenotypové přeměně na myofibroblasty. Kromě produkce komponent extracelulární matrix, jsou také kontraktilní a jsou tedy schopny omezovat průtok krve sinusoidami, a tak přispět k rozvoji portální hypertenze.

K aktivaci hvězdicových buněk dochází také účinkem látek produkovaných poškozenými **hepatocyty**, které se také podílejí na fibrogenezi. Z jejich membrán se při poškození uvolňují látky stimulující proliferaci hvězdicových buněk. Hepatocyty také produkují široké spektrum dalších profibrogenních a promitogenních cytokinů, které působí společně s faktory uvolňovanými Kupfferovými buňkami.

V průběhu zánětlivých pochodů v játrech se i z dalších speciálních buněk fibrogeneze uvolňují látky stimulující proliferaci hvězdicových buněk a působící integračně v procesu fibrogeneze. Jsou to zejména již zmíněné **Kupfferovy buňky**, z nichž se po jejich aktivaci

uvolňují transformující růstový faktor β (TGF β) a transformující růstový faktor α (TGF α). Patří k nim dále **trombocyty**, uvolňující destičkový růstový faktor (PDGF) a TGF β , a také **endoteliální sinusoidální buňky** produkující endotelin. **Monocyty a další buněčné elementy** produkují růstový faktor pojiva (CTGF), INF γ , IL 1-6 a 13 a další peptidické nebo nepeptidické látky jako reaktivní kyslíkové radikály, oxid dusný, leptin, acetaldehyd, laktát a další (Benyon 2000). Ale i hvězdicovité buňky transformované na myofibroblasty sami uvolňují růstové faktory, a tak svou autokrinní aktivitou podporují fibrogenезi.

V důsledku nárůstu vaziva v Disseho prostorech se mění charakter jaterních sinusoidů. Fenestrace, která je normálně mezi jednotlivými endoteliálními sinusoidálními buňkami, umožňuje transport látek z krve přes Disseho prostory do hepatocytů a naopak. V důsledku zmnožení kolagenu a dalších komponent vaziva zaniká. Tento jev je nazýván kapilarizací jaterních sinusoidů. Endoteliální sinusoidální buňky zvětšují svůj objem a začínají produkovat IL-1, PDGF a fibronectin, podílející se na aktivaci Itových buněk. Endoteliální buňky také negativně ovlivňují degradaci extracelulární matrix. Důsledkem působení TGF β na endoteliální sinusoidální buňky je nižší hodnota plasminogenu. Plasmin představuje aktivátor metaloproteináz, které degradují extracelulární matrix (Rieder 1993).

Vazivové změny začínají jako perisinusoidální fibróza. V jejím důsledku dochází nejen ke zhoršení zásobování hepatocytů kyslíkem a výživnými látkami, ale také k postupné přeměně dynamické cévní jaterní resistance, která vzniká v důsledku endoteliální dysfunkce, na resistenci mechanickou. (Schuppan 1999). Důsledkem kapilarisace sinusoidů a zmnožení vaziva v Disseho prostorech je tedy nejen zhoršení funkce hepatocytů, ale také portální hypertenze. O fibróze hovoříme, dojde-li k 3-6 tinásobnému vzestup objemu matrix (Hahn 1987). Proces fibrotizace může probíhat pericelulárně a centrolobulárně, jak je tomu u alkoholového jaterního poškození, u NAFLD, u hereditární hemochromatózy či v důsledku chronického pravostranného srdečního selhání a Buddova-Chiariho syndromu. Nebo jde o septální a biliární fibrózu, ke které dochází u chronických virových hepatitid, primární biliární cirhózy nebo primární sklerózující cholangitidy.

1. 2. 2.Extracelulární matrix

Tvoří ji 3 různé typy makromolekul.

- Kolagen typu I, III, V a VI tvořící fibrily v intersticiu
- Bazální membránový kolagen IV
- Nekolagenní glykoproteiny
 - Glykoproteiny - fibronectin, laminin, tenascin, undulin
 - Proteoglykany- vitronectin, aggrecan, biglycan, perlecan, syndecan, decordin
 - Glykosaminoglykany představují část proteoglykanů - kyselina hyaluronová (HA), chondroitinsulfát, dermatansulfát.

Díky fibróze stoupá obsah kolagenu v játrech. Nejdříve přibývá kolagen III, později zásadně převládne obsah kolagenu I, který představuje průměrně 60-70 % veškerého kolagenu v cirhotických játrech. Ve fibrotických játrech je tedy poměr kolagenu I : kolagenu III 4:1, zatímco v normálních játrech je tento poměr 1:1 (Montgomery Bissel 1996).

Kolageny typu IV, V a VI jsou převážně ve fibrózních septech spolu s lamininem, undulinem a tenascinem. Stoupá i obsah proteoglykanů tj. kyseliny hyaluronové (HA), dermatansulfátu a chondroitinsulfátu (Válková 2002).

1.3. Fibrolýza – degradace matrix

Tvorba a degradace matrix jsou ovlivněny růstovými faktory TGF β , TGF α , TNF a PDGF.

Rozvoj jaterní fibrózy ale není jen záležitostí zvýšené tvorby extracelulární masy, ale také její snížené degradace. Za normálního stavu jsou tvorba, tedy fibrogenese a odbourávání, tedy fibrolýza, tak vyrovnané, že mezibuněčná hmota se současně tvoří a odbourává. Při persistenci fibrogenetické noxy tj. virů, abusu alkoholu, cholestázy, toxinů a jiných látek, se mezibuněčná hmota nadměrně tvoří, ale i hůře degraduje, přičemž některé působky speciálních buněk nepříznivě degradaci ovlivňují. Základními prvky degradace matrix jsou metaloproteinázy.

Matrix metaloproteinázy (MMP)

- Intersticiální kolagenázy - MMP 1, 8, 13
- Gelatinázy - MMP 2, 9
- Stromelyzíny - MMP 3, 7, 10, 11
- Membránový typ metaloproteináz - MMP 14, 15, 16, 17, 24, 25
- Metaloelastázy - MMP 12

Nicméně, proces degradace je o to složitější, že existuje také několik typů tkáňových **inhibitorů metaloproteináz** - TIMP 1-3, tedy látek působících fibrogeneticky (Arthur1995). Matrix sama hraje tedy významnou roli v mezibuněčné komunikaci a účastní se regulace fibrogenese a významně také ovlivňuje funkci hepatocytů.

2. Diagnostika jaterní fibrózy

2. 1. Histologie

2.1.1. Jaterní biopsie a histologické vyšetření vzorku jaterní tkáně

Histologické vyšetření jaterní tkáně je více než 100 let „zlatým standardem“ v diagnostice jaterních onemocnění. Poprvé byla jaterní biopsie provedena Ehrlichem v roce 1883 ke stanovení obsahu glykogenu v játrech u diabetika. Jaterní biopsie nebyla až do třicátých let minulého století příliš používána. Pro všeobecné užití ji zavedli až Huard a spol ve Francii a Barron v USA. Prvním, kdo provedl jaterní biopsii u akutní epidemické hepatitidy byl v roce 1939 Roholm (Roholm K..1939).

Jednotlivé jaterní biopsie se mohou lišit způsobem provedení: volba jehly, tzv. naslepo nebo cílená biopsie pod UZ nebo CT kontrolou nebo transjugulární jaterní biopsie u pacientů s významnou trombopenií nebo koagulopatií. Perkutánní jaterní biopsie je poměrně bezpečný výkon, ale i tak se mohou vyskytnout komplikace, nejčastěji bolest, asi u 30 % bioptovaných pacientů. Seznam komplikací je uveden v tabulce č. 1

Smrtelné komplikace se vyskytují zřídka, úmrtí v souvislosti s jaterní biopsií byla zaznamenána v 0,0088 - 0,3 % případů (Scherlocková S. 2002).

Větší počet případů závažných krvácení a úmrtí spojených s perkutánní jaterní biopsií byl zaznamenán u pacientů s rozvinutou fibrózou, cirhózou a nádory jater (Terjung 2003). U těchto pacientů se doporučuje provést jaterní biopsii při hospitalizaci, protože více než 90 % komplikací se manifestuje během 24 hodin po biopsii (Piccinino 1986).

Tabulka č. 1

Typ komplikace	Procenta
Bolest: pleurální, peritoneální, diafragmatická	0.056 - 22
Krvácení: intraperitoneální, intrahepatální, subkapsulární, hemobilie	0.03 – 0.7
Biliární peritonitida	0.03 – 0.22
Absces jater a sepse	0.088
Pneumothorax nebo fluidothorax	0.08 – 0.28
Hemothorax	0.18 – 0.49
Arteriovenózní píštěl	5.4
Podkožní emphysem	0.014
Reakce na anestetikum	0.029
Zlomení jehly	0.02 – 0.059
Biopsie jiných orgánů: plíce	0.001- 0.014
žlučník	0.034- 0.11
ledvina	0.096–0.029
tračník	0.0038–0.044
Úmrtí	0.0088–0.3

Přehled komplikací po jaterní biopsii (Al Ghamdi 2010)

2.1.2. Přínos histopatologického vyšetření

Závisí na velikosti vzorku a počtu portálních polí. Získaný vzorek by měl být 20 mm dlouhý a obsahovat nejméně 4 portální pole. Reprezentativní, kvalitně odebraný váleček jaterní tkáně představuje 1/50000 celého orgánu.

Preparáty jsou připraveny po nakrájení vzorku na mikrotomu (obvyklá tloušťka je 5 µm), uchyceny na podložní skla a barveny. Vzorky jsou standardně barveny hematoxylinem-eosinem, pro hodnocení jaterní fibrózy se barví metodami dle van Giesona a Gomoriho.

Mezi základní histologické znaky chronických hepatitid patří zánět (portální, periportální, lobulární), nekróza/apoptóza (periportální, lobulární, fokální, splývající) a fibróza (septa, cirhóza). Pojem grading hodnotí aktivitu zánětu, pojem staging hodnotí stupeň fibrózy. Zastřešujícím pojmem je index histologické aktivity (Histological Activity Index - HAI).

V současnosti jsou užívány k hodnocení histologických nálezů tyto systémy:

- klasifikace dle Battse a Ludwiga,
- klasifikace METAVIR
- klasifikace dle Ishaka.

Battsova - Ludwigova klasifikace chronických hepatitid zahrnuje hodnocení etiologie, grading zánětu a staging fibrózy (Ehrmann J.jr 2010).

2.1.3. Battsova-Ludwigova klasifikace chronických hepatitid (Batts KP 1995)

- Etiologie:
 - Autoimunní hepatitida
 - Chronická hepatitida B
 - Chronická hepatitida B a D
 - Chronická hepatitida C
 - Chronická hepatitida poléková
 - Chronická hepatitida kryptogenní
 - Wilsonova choroba
 - Deficit alfa 1- antitrypsinu
- Grading - hodnocení aktivity zánětu viz tabulka č. 2 a obrázek č. 1
- Staging hodnocení stupně fibrózy viz tabulka č. 3 a obrázek č. 2

Tabulka č. 2

Stadium	Portální (piecemeal nekrózy)	Lobulární
0	žádné	Žádné
1	portální zánět	zánět bez nekrózy
2	Lehká nekróza limitující membrány	fokální nekróza
3	mírná nekróza limitující membrány	výraznější nekróza
4	výrazná nekróza limitující membrány	bridging nekróza

Grading - hodnocení aktivity zánětu.

Tabulka č. 3

Stadium	Fibróza
0	žádná fibróza
1	rozšířená portální pole
2	porto-portální septa, intaktní architektura
3	porto-centrální septa, porušená architektura
4	cirhóza

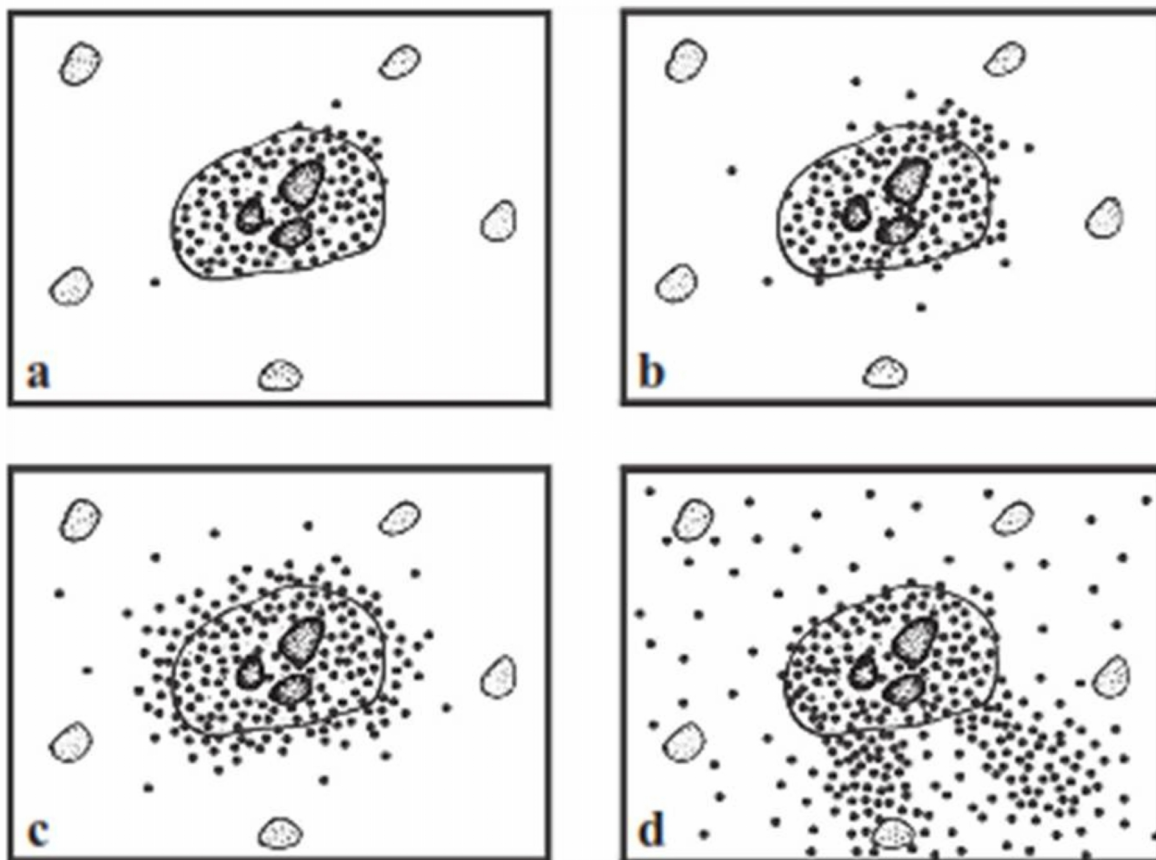
Staging – hodnocení stupně fibrózy

Úskalím jaterní biopsie není jen riziko komplikací, ale i možnost rozdílného interindividuálního hodnocení. Podle studií Gronbaeck a Petze (Gronbaeck 2002, Petze 2003) dochází k intra i interindividuálním rozdílům v hodnocení asi ve 20 % případů. Příčinou je nejčastěji nedostatečná velikost vzorku. Podobně byla popsána variabilita i v hodnocení stupně fibrózy u vzorků z pravého a levého jaterního laloku. Zmíněné studie uvádějí rozdíly až v 38 % případů (Grunhage 2010).

Význam jaterní biopsie u chronické hepatitidy C je v hodnocení stagingu a gradingu, ale je možné odhalit i jiné faktory, podílející se na vzniku jaterního poškození (alkohol, akumulace železa a jiné).

Saadeh a spol. však prokázal výskyt nečekaných histologických nálezů ve skupině 126 bioptovaných osob pouze ve 2 %, navíc šlo pouze o varianty steatózy nebo steatohepatitidy různé etiologie (Urbánek 2004). Histologické podoby jednotlivých stadií chronické hepatitidy C, včetně jaterní cirhózy jsou na obrázku č. 3.

Obr. č. 1



Schematické znázornění gradingu zánětu(modifikováno dle Batts KP,Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. The American Journal of Surgical Pathology 1995;1409-1417):

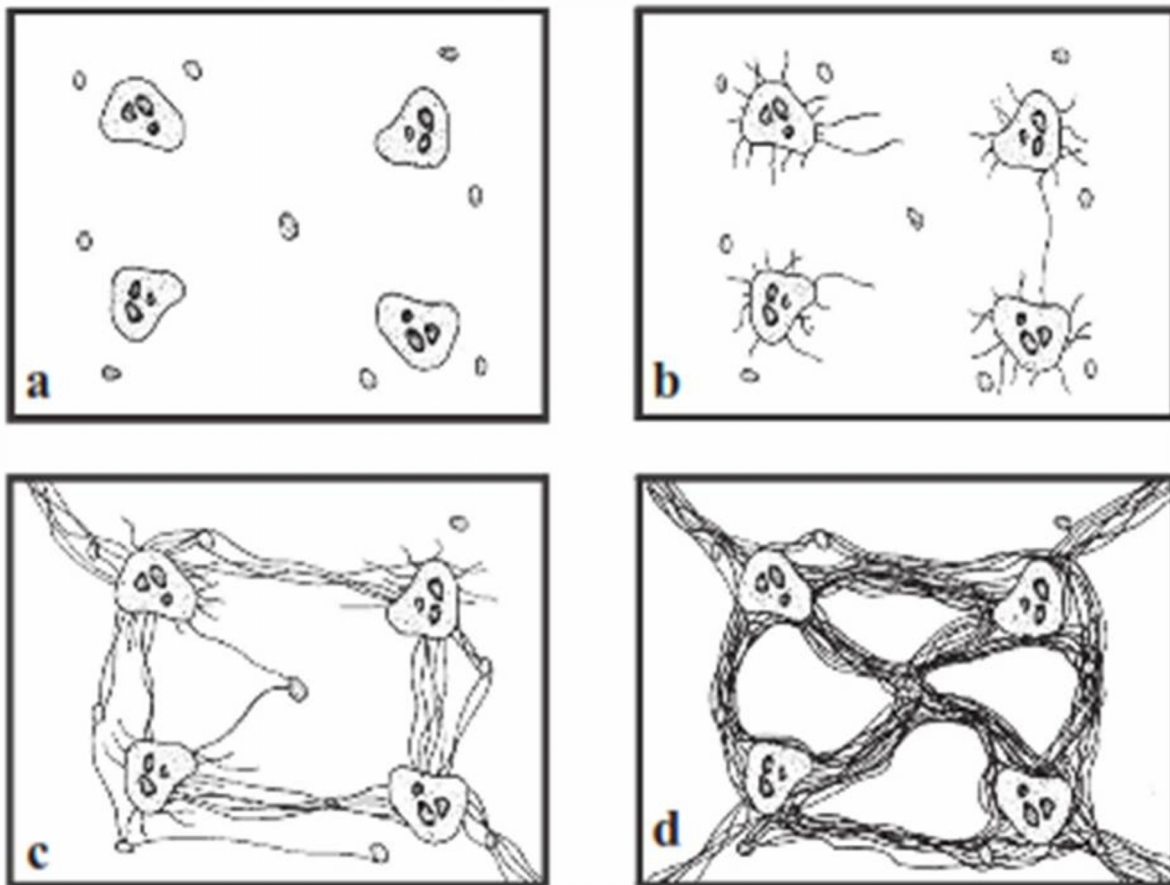
a/ portální zánět,grade I

b/portální a mírný periportální zánět, grade 2

c/periportální zánět, grade 3

d/ výrazný periportální zánět, grade 4

Obr. č. 2



Schematické znázornění stagingu fibrózy (modifikováno dle Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. The American Journal of Surgical Pathology 1995;1409-1417):

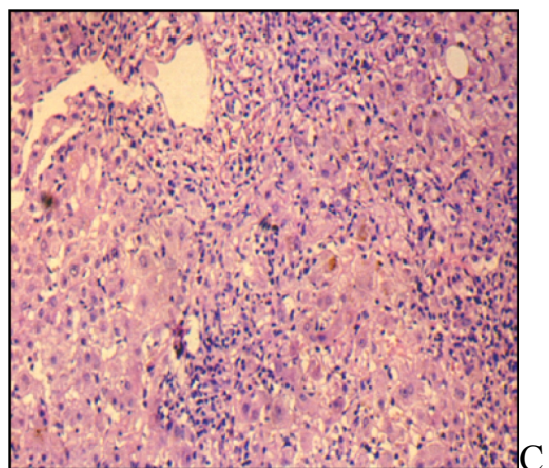
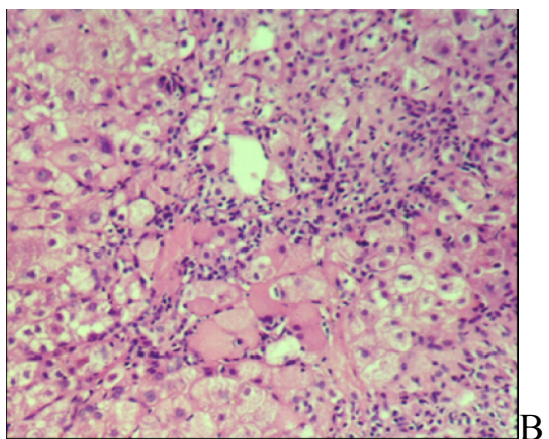
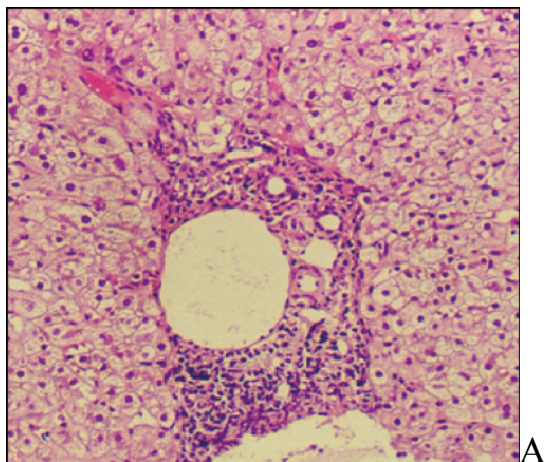
a/ žádná fibróza, stage 0

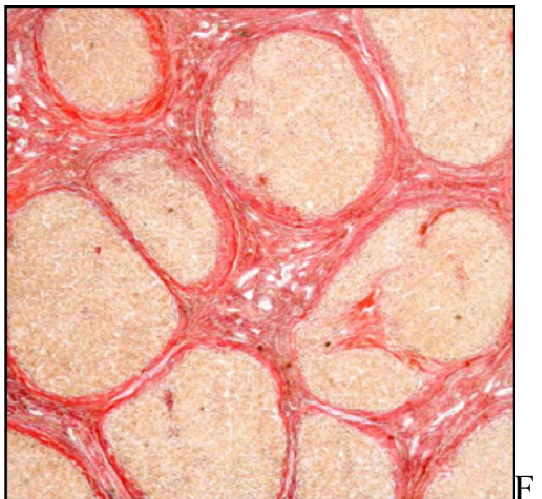
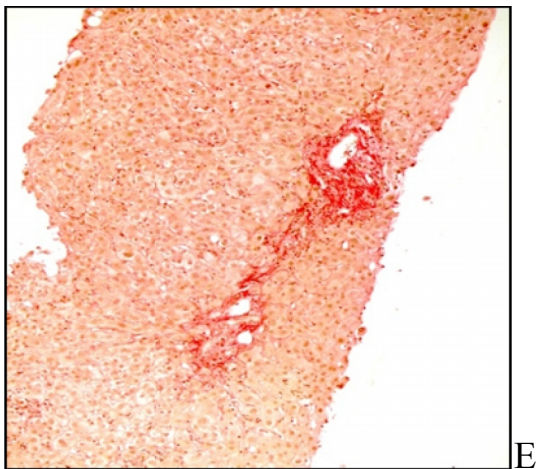
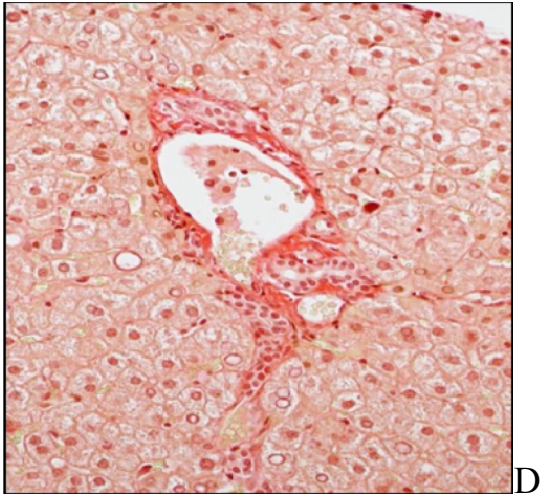
b/ rozšířená portální pole, stage 1

c/ porto-portální septa, místy porto-centrální septa, stage 2-3

d/ cirhóza, stage

Obr.č.3





- A: F1 periportální fibróza
B,C: F2 septální fibróza
D,E: F3 fibróza s přemostujícími septy
F: F4 cirhóza

2. 2. Neinvazivní metody diagnostiky jaterní fibrózy

V posledních letech je snahou najít postupy, které by mohly nahradit jaterní biopsii, zejména s ohledem na její rizika, kontraindikace a pacientův dyskomfort, tj. hlavně bolest a strach z výkonu. Někteří nemocní se dokonce domnívají, že provedená jaterní biopsie může zhoršit jaterní chorobu.

Předmětem celé řady studií je srovnávání výsledků vyšetření laboratorních, matematických modelů a zobrazovacích metod se stupněm fibrózy zjištěným při histologickém vyšetření.

Mezi neinvazivní diagnostické metody jaterní fibrózy patří následující:

- sérové markery
- zobrazovací metody
- testy jaterních funkcí, v podstatě dechové testy
- měření tuhosti jater
- kombinace metod

Histologie je stále „zlatým standardem“ v diagnostice jaterní fibrózy, i když neinvazivní postupy již získávají své místo. Francouzské lékařské autority oficiálně schvalují upřednostnění neinvazivního způsobu diagnostiky fibrózy u pacientů s chronickou hepatitidou C před jaterní biopsií. Na prvním místě doporučují vyšetření sérových markerů fibrózy tzv. biomarkery, zejména FibroTest a elastografii fibroscanem. Jaterní biopsii až jako druhou volbu při rozporných nebo těžko interpretovatelných výsledcích (Thabut 2008).

2.2.1. Sérové markery jaterní fibrózy - biomarkery

Zahrnují řadu molekul, enzymů a testů, které odrážejí v různé míře přítomnost a stupeň fibrózy, a jejich užití je možné jak v okamžiku stanovení diagnózy, tak k monitorování progresu či ústupu fibrotických změn v průběhu onemocnění a během antivirové event. antifibrotické léčby.

Ideální sérový marker jaterní fibrózy by měl být specifický pro játra, nezávislý na metabolických změnách, minimálně ovlivnitelný změnami exkrece žluči a onemocněním ledvin. Dalšími požadavky jsou snadné provedení a možnost opakování.

U ideálního markeru očekáváme, že bude reflektovat fibrózu u všech jaterních onemocnění různé etiologie, a že bude dostatečně citlivě odlišovat jednotlivé stupně fibrózy.

2.2.1.1. Sérové markery I. třídy – tzv. nerutiní markery

jde o tzv. nerutiní markery, jejichž užití vychází přímo z poznatků o jaterní fibrogenезi. Patří mezi ně markery značící syntézu nebo degradaci kolagenů, dále enzymy, které se účastní této syntézy a degradace, glykoproteiny mimobuněčné hmoty, proteoglykany a cytokiny účastnící se regulace fibrogenезe a řada dalších faktorů, včetně tzv. jaterních testů, laboratorních známek koagulopatie a hodnocení věku a pohlaví.

Kyselina hyaluronová (HA)

Patří mezi glykosaminoglykany. Je produkována hvězdicovými buňkami a rovněž z velké části je játry eliminována. Jen v malé míře je vylučována ledvinami. Koncentrace HA v normálních játrech je nízká, ve fibrotických játrech stoupá 2-10krát. Její sérová koncentrace je signifikantně zvýšená u jaterní cirhózy, cut-off je 60 µg/l. Elevace sérových hodnot HA odráží zvýšenou aktivitu hvězdicových buněk a sníženou clearance endoteliálními buňkami jater.

Samostatné vyšetření HA nemůže nahradit jaterní biopsii v diagnostice stupně fibrózy, ale je vhodné k dlouhodobému sledování progresu onemocnění (Korner 2003, Vozar2005). Bylo dále prokázáno, že sérová hladina HA klesá u pacientů s chronickou hepatidou C během léčby interferonem alfa. U nich bylo také histologicky prokázáno zlepšení stagingu (Kupčová 2002). Pokles sérové hladiny HA byl provázen zlepšením fibrózy, zatímco nárůst znamenal zhoršení stagingu (Guéchet 1995). U onemocnění jater ethylického původu byl zaznamenán pokles sérové hladiny HA při abstinenci (Parés 1996).

HA je ale hlavně součástí dalších testů, které jsou zahrnuty do skupiny markerů II. třídy: Hepascore, Fibrospect II a SHASTA index.

Laminin

Jde o glykoprotein bazální membrány o vysoké molekulové hmotnosti složený ze 3 polypeptidových řetězců. Jeho koncentrace přímo úměrně narůstá se stupněm jaterní fibrózy. Zvýšení lamininu je popsáno u chronických jaterních onemocnění různé etiologie. Je také senzitivním markerem akutní alkoholové hepatitidy (Collazos 1993).

Sérová hladina lamininu se mění při odstranění vyvolávající příčiny hlavně při alkoholové abstinenci, méně často při léčbě chronické hepatitidy C (Nimela 1990, Fabris 1999). Hodnoty lamininu v séru vykazují korelaci s Child-Pugh skóre (Korner 1996). Stanovení lamininu

v séru je také vhodnější k rozlišení fibrózy a cirhózy než stanovení aminoterminálního propeptidu prokolagenu III (Kropf 1998).

YKL- 40 (Chondrex)

Odráží degradaci a remodelaci extracelulární matrix. Jeho hodnota dobře reflektuje stupeň fibrózy. Patří do skupiny savčích chitináz (18 glykosylhydroxyláz), je secernován hvězdovitými buňkami a během fibrogenese byla jeho sekrece popsána i makrofágy a aktivovanými neutrofily. Fyziologická jeho funkce není přesně objasněna, je růstovým faktorem fibroblastů, chondrocytů a synoviálních buněk (Saitou 2005). Johansenová a Christoffersen porovnávali, jak sérové hodnoty YKL-40, HA a PIIINP reflektují jednotlivé stupně fibrózy u chronických virových hepatitid, posthepatitické cirhózy a alkoholového onemocnění jater. Prokázali, že YKL-40 se zvyšuje u pacientů s chronickým jaterním onemocněním. Nejvyšších hodnot dosahuje u alkoholové cirhózy (medián 532 μ g/l je 5x vyšší ve srovnání se zdravými jedinci), zvýšen je také u posthepatitické cirhózy (425 μ g/l) a fibrózy (330 μ g/l). U zdravých osob se hladina YKL-40 pohybuje od 102 do 247 μ g/l. Individuální hodnoty YKL-40 korelují se stupněm fibrózy. Ze studie vyplývá, že vyšetření YKL-40 v séru je přínosnější pro stanovení časných stadií fibrózy než HA a PIIINP (Johansen, Christoffersen 2000).

Saitou popsal změny sérových hodnot YKL-40, PIIINP a HA u pacientů, kteří byli léčeni interferonem pro chronickou hepatitidu C. U pacientů, kteří dosáhli setrvalé virologické odpovědi (SVR) zaznamenal signifikantní pokles sérových hladin zmíněných markerů zároveň se zlepšením histologického nálezu (Saitou 2005).

Alfa-2-makroglobulin (A2M)

Je to protein akutní fáze, který je secernován hepatocyty a aktivovanými Itovými buňkami (Naveau 1994). Zároveň je proteázovým inhibitorem a jeho zvýšená syntéza může negativně ovlivnit katabolismus proteinů matrix a tím přispět k progresi fibrózy (Imbert-Bismut 2001). Normální hodnoty jsou 1,3-3,0 g/l. Při jaterní fibróze dochází k nárůstu hodnoty A2M (Turecky 2003). Je považován za spolehlivý a přínosný marker jaterní fibrózy a je zahrnut do matematických modelů jaterní fibrózy: FibroTest, ActiTest, PGAA index, Patelovo skóre, FibroMeter, Hepascore.

N-terminální peptid prokolagenu typu III (PIIINP)

Jde o marker depozice kolagenu typu III. Vzniká při konverzi prokolagenu III na kolagen III (Poupon 1996). PIIINP je tvořen v Itových buňkách a jeho sérová koncentrace reflektuje obrat kolagenu typu III. Zvýšená hladina PIIINP znamená depozici kolagenu III, zejména v časných stadiích fibrogenese (Teare JP 1993). Není specifický pro játra, jeho vyšší hodnoty jsou známé také při plicní fibróze, chronické pankreatitidě, akromegalii a revmatických chorobách.

Z jaterních chorob je elevace PIIINP popsána u chronické hepatitidy C, alkoholového jaterního onemocnění a u primární biliární cirhózy. Jeho hodnota klesá při efektivní léčbě základní příčiny, tj alkoholové abstinenci a léčbě interferonem (Teare 1993, Giannini 2001).

PIIINP se nejeví jako vhodný parametr pro sledování portální hypertenze, a to i tehdy, pokud je vyšetřena hladina P IINP v jaterních žilách (Gressner 1988).

Karboxy-terminální peptid prokolagenu typu I (PICP)

Je markerem přeměny prokolagenu I na kolagen I. Je zvýšen u pacientů s jaterní cirhózou, není však tak přesný jako PIIINP nebo kolagen IV (Gallorini 1994).

Kolagen typu IV (CL-4)

Je spolu s lamininem součástí bazálních membran. Elevace kolagenu IV v séru citlivě odráží všechna stadia jaterní fibrózy.

Zvýšení hladiny CL-4 je citlivým indikátorem těžké fibrózy u chronických virových hepatitid a u hereditární hemochromatózy. Je citlivějším ukazatelem fibrózy než laminin, HA a PIIINP. (Yokoya 1992, George 1999).

U nemocných s chronickou hepatitidou C může mít jeho hodnota prediktivní význam stran odpovědi na léčbu interferonem. Nižší jeho sérové hladiny před léčbou byly u pacientů, kteří dosáhli pozdější trvalé virologické odpovědi (Yabu 1994).

Kolagen typu VI (CL-6)

Je komponentou extracelulární matrix, ale jeho zastoupení je poměrně malé. Spolu s kolagenem I je aktivován v časných stadiích fibrózy a jeho akumulace v játrech byla popsána při progresi jaterní fibrózy (Takahara 1995).

Tenascin

Je glykoproteinem extracelulární matrix. Signifikantní korelace mezi sérovou hladinou tenascinu a bílkovinami extracelulární matrix PIIINP, lamininem a CL-4 popsal Yamauchi. Přitom hladina tenascinu narůstá přímo úměrně se stupněm fibrózy (Yamauchi 1994).

Undulin

Je rovněž součástí extracelulární matrix, vyskytuje se v blízkosti sinusoidů a centrálních vén. V normálních játrech je jeho hodnota nízká, naopak při fibrogenezi se depozice undulinu podílí na tvorbě sept (Milani 1994).

Fibronectin

Jde o glykoprotein, jehož hladina narůstá při fibrogenezi a jeho sérové hodnoty mohou pomoci odlišit pacienty s jaterní fibrózou při chronické hepatitidě C. Sérové hodnoty fibronectinu ve studii porovávající soubor pacientů s chronickou hepatitidou C a zdravé jedince byly 450 µg/l (+/- 170,3) u HCV nemocných a 230 µg/l (+/-90,3) u zdravých lidí. (Attalah 2007).

Testy degradace extracelulární masy reprezentují matrix metaloproteinázy (MMP). Degradaci ale také ovlivňují tkáňové inhibitory matrix metaloproteinázy (TIMP). Markery jsou užívány jednotlivě nebo v kombinaci s dalšími biochemickými parametry. Index PIIINP/MMP-1 signifikantně koreluje se stupněm fibrózy a je považován za lepší ukazatel než HA a TIMP-1.

Matrix metaloproteinázy

Změny v aktivitě MMP reflektují patologickou degradaci extracelulární matrix v játrech (Scherlocková S. 2004). Jejich aktivita je kontrolována na různých úrovních, včetně inhibice skupinou antagonistů, tj tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP).

Nejvýznamnější enzymy jsou MMP-2 (gelatináza A nebo 72-kDa kolagenáza typu IV) a MMP9 (gelatináza B nebo 92kDa kolagenáza IV).

MMP-2 je secernována aktivovanými hvězdicovými buňkami. Významně zvýšená její hodnota je charakteristická pro cirhózu (Boeker 2002).

Přínosné je vyšetření poměru MMP-2 a TIMP-1 k predikci trvalé odpovědi na interferonovou léčbu chronické hepatitidy C (Kasahara 1997).

MMP-9 je secernována převážně aktivovanými Kupfferovými buňkami. Její sérová hladina je zvýšená zejména u nemocných s hepatocelulárním karcinomem. U pacientů s chronickou hepatitidou nebo cirhózou se hodnota MMP-9 neliší od normálních kontrol (Hayasaka 1996).

Tkáňový inhibitor matrix metaloproteinasy (TIMP)

TIMP -1 a TIMP-2 jsou signifikantně zvýšené u nemocných s pokročilou fibrózou, zatímco normální plasmatická hladina TIMP-1 vylučuje rozvinutou fibrózu (Ueno 1996, Walsh 1999).

Prolylhydroxyláza

Je markerem syntézy kolagenu. Její aktivita se zvyšuje zároveň s narůstajícím stadiem fibrózy u chronické virové hepatitidy (Bakir 1989).

N-acetylglucosaminidasa (NAG)

Je to lysozomální enzym, který je maximálně zastoupen v játrech a ledvinách. Zvýšená aktivita NAG byla zjištěna u pacientů s chronickými jaterními onemocněními. Vyšší aktivita byla popsána ve skupině pacientů s cirhózou, než ve skupině pacientů s chronickou hepatitidou (Turecky 1985).

V procesu jaterní fibrogenese se uplatňují i cytokiny, jejichž sérové hodnoty mohou odrážet tíži fibrotických změn v játrech. Jsou to zejména TGF β , TGF α a PDGF. Závažnost fibrózy koreluje s hodnotami těchto cytokinů. TGF α se uplatňuje při kancerogeneze u hepatocelulárního karcinomu (Nelson 1997, Harada 1999).

Seznam nerutiných markerů jaterní fibrózy je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4

Marker	Serum	Urine	Biopsy	Method	Clinical application
Prolylhydroxylase	+	-	+	REA, RIA	(+)
Monoaminoxidase	+	-	(+)	Enzymatic	-
Lysyloxidase	+	-	+	RIA	-
Lysylhydroxylase	+	-	-	RIA	-
Galaktosylhydroxylsylglukosyltransferase	+	-	+	RIA	-
Collagenpeptidase	+	-	+	Enzymatic	-
N-acetyl-beta-D-glukosaminidase	+	+	+	Enzymatic	(+)
Collagen typ I					
N-terminal propeptide (PINP)	+	-	+	ELISA	-
C-terminal propeptide (PICP)	+	-	+	RIA	-
Collagen typ III					
Intact procollagen	+	-	-		
N-terminal propeptide (PIIINP)					
Globular domain of propeptide (Col-1)	+	-	-	RIA	+
Collagen typ IV					
NC1-fragment [C-terminal] (PIVP)	+	+	-	ELISA, RIA	(+)
7S domain (7S collagen)	+	+	-	RIA	(+)
Collagen typ VI					
Laminin, P1-fragment	+	-	-	RIA, EIA	(+)
Undulin	+	-	-	EIA	-
Vitronectin	+	-	-	EIA	-
Tenascin	+	-	-	ELISA	-
YKL-40	+	-	+	RIA, ELISA	(+)
(pro) MMP-2	+	-	-	ELISA	(+)
TIMP-1, TIMP-2	+	-	-	ELISA	(+)
Hyaluronic acid	+	-	-	RIA, ELISA	++

Nerutinní markery jaterní fibrózy podle Gressner AM. 2009.

2.2.1.2. Sérové markery II. třídy – tzv. rutinní markery

Jsou nazývány „rutinními markery“ a jsou odvozeny od standardních laboratorních testů, nesouvisí bezprostředně s patogenezí fibrózy, ale při fibróze a cirhóze se mění. Byly vybírány tak, aby za použití různých matematických modelů poskytovaly co nejlepší nástroj pro detekci fibrózy a pro staging a grading jaterního onemocnění. Bylo navrženo mnoho různých kombinací parametrů, včetně ukazatelů porušené integrace hepatocytů - AST, ALT, dále koagulačních testů, stanovení transportních proteinů, bilirubinu a dalších.

Často se bere v úvahu pokles počtu trombocytů, způsobený u cirhotiků jejich sekvestrací do zvětšené sleziny a sníženou syntézou trombopoetinu v metabolicky insuficientních játrech.

Transaminázy ALT, AST

Jsou nejčastěji používané enzymy značící jaterní poškození, jsou indikátorem prostupnosti membrán hepatocytu a integrity jaterní buňky, jsou veličinami užívanými ve většině matematických modelů vyšetřujících jaterní fibrózu.

Poměr AST/ALT je označován jako de Ritisův koeficient.

U většiny zdravé populace je tento poměr přibližně 0,8. V řadě studií byly porovnány výsledky de Ritisova koeficientu s histologickými nálezy (Sheth 1998, Giannini 2003). Hodnota >1 značí přechod do cirhózy. Podle studie Parka na souboru 153 pacientů má tento poměr pozitivní prediktivní hodnotu 73,7% (Park 2000).

Haptoglobin

Plazmatický glykoprotein syntetizovaný v játrech je nepřímo úměrný stupni jaterní fibrózy. Význam haptoglobinu spočívá ve vazbě volného hemoglobinu kolujícího v plasmě. Při infekcích a maligních onemocněních má haptoglobin tendenci ke vzestupu, proto je v těchto případech nutná opatrnost při hodnocení. Jeho vysoká hladina je při hemolýze.

Apolipoprotein A1

Je tvořen v játrech, je součástí extracelulární matrix a jeho sérová hladina se snižuje s narůstajícím stupněm fibrózy.

Bilirubin

Je často užívaným parametrem, vypovídá o jaterní nedostatečnosti, musíme však vyloučit hemolýzu a cholestázu.

Fornsův index

Byl sestaven s cílem neinvazivně odlišit pacienty s přítomností signifikantní fibrózy F2-4 a bez signifikantní jaterní fibrózy F0-1. Ve studii autora tohoto indexu bylo 476 pacientů s naivní chronickou hepatitidou C, kteří podstoupili jaterní biopsii. Model kombinuje 4 veličiny: věk, gamaglutamyltransferázu (GGT), trombocyty a cholesterol. Výpočet je podle vzorce:

$$7,811-3,131.\ln(PLT)+0,781.\ln(GGT)+3,467.\ln(\text{věk})-0,014.(\text{cholesterol})$$

Ze studie vplynuly 2 cut-off hodnoty:

< 4,2 znamená absenci signifikantní fibrózy (s 96% jistotou)

>6,9 znamená přítomnost signifikantní fibrózy

Věk byl zvolen jako parametr, protože stupeň fibrózy je závislý na času, přesnějším indikátorem než věk však bylo trvání HCV infekce. Nízký počet trombocytů je známkou těžké fibrózy. Trombocytopenie je u pacientů s pokročilým jaterním onemocněním často spojena s portální hypertenzí a sníženou tvorbou trombopoetinu. Zvýšená aktivita GGT je nezávislým prediktorem poškození žlučovýchodů, ke kterému u HCV infekce často dochází. Cholesterol by měl odrážet syntetickou funkci jater. U HCV infekce byly zaznamenány nižší hodnoty cholesterolu než u pacientů s infekcí virem hepatitidy B (Forns 2002). Cholesterol je však jako parametr fibrózy kritizován. Thabuta namítá, že cholesterol omezuje užití Fornsova indexu u pacientů infikovaných genotypem 3, protože nemocní s tímto genotypem HCV mívají nižší sérovou hladinu cholesterolu, která se normalizuje až po eradikaci viru (Thabuta 2003)..

APRI

Wai a kolektiv označili ve své studii za nejdůležitější prediktory fibrózy aktivitu AST a počet trombocytů a jejich vzájemný poměr.

$$APRI = \frac{AST(/ULN)}{PLT(10^9/L)} \times 100$$

V této studii z roku 2003 bylo sledováno 270 pacientů a jejím cílem bylo vytvořit jednoduchý matematický model ke sledování fibrózy u pacientů s chronickou hepatitidou C, který by vycházel z běžně vyšetřovaných parametrů.. V mnoha předchozích studiích jiných autorů byly popsány u nemocných s chronickou hepatitidou C elevace AST a klesající počet trombocytů.

Nebyly jednoznačně identifikovány jejich cut-off hodnoty pro přítomnost signifikantní fibrózy a cirhózy. V této studii u 51 % nemocných byly hodnoty odpovídající signifikantní fibróze vyšší než 0,5, u 81 % pacientů s cirhózou byly hodnoty APRI vyšší než 2,0 (Wai 2003).

Lin a kolektiv publikovali metaanalýzu 40 studií ve kterých byl APRI index srovnán s histologickými nálezy. Výsledkem bylo zjištění, že APRI index s prahovou hodnotou 0,7 má 77% senzitivitu a 72% specificitu pro signifikantní fibrózu a prahová hodnota 1,0 má 76% senzitivitu a 72 % specificitu pro cirhózu (Lin 2011).

FibroTest (Fibrosure)

Jde o identické testy s různými názvy pro Evropu a Ameriku.

Jsou to patentované, ve velké míře profesionálně užívané testy, kalkulující s výsledky 6 parametrů.

FibroTest byl poprvé prezentován v roce 2002 na kongresu Digestive Diseases Week v San Franciscu. Studie zahrnovala 125 pacientů s chronickou hepatitidou C, kteří podstoupili jaterní biopsii ve stejném čase jako krevní testy.

Skóre bylo počítáno z těchto parametrů: věk, pohlaví, alfa-2 makroglobulin, bilirubin, aktivita GGT, apolipoprotein A1 a haptoglobin.

Rovnice pro výpočet FibroTestu je následující:

$$z = 4,467 \times \log_{10} [\text{alfa2makroglobulin(g/L)}] - 1,357 \times \log_{10} [\text{haptoglobin(g/L)}] + 1,017 \times \log_{10}[\text{GGT(IU/L)}] + 0,0281 \times [\text{věk(roky)}] + 1,737 \times \log_{10}[\text{bilirubin}(\mu\text{mol/L})] - 1,184 \times [\text{apolipoprotein A1(g/L)}] + 0,301 \times \text{pohlaví}(\text{žena}=0, \text{muž}=1) - 5,54$$

Hodnota FibroTestu < 0,1 je negativním prediktivním znakem fibrózy F2-4 s 85% senzitivitou, pozitivní prediktivní znakem pro fibrózu F2-4 je hodnota > 0,6 se 78% senzitivitou (Rossi 2003).

Pozdější práce již připouští FibroTest jako alternativu jaterní biopsie (Halfon 2006).

Výsledek FibroTestu je možné rovněž spočítat na webových stránkách společnosti BioPredictive ([www. biopredictive.com](http://www.biopredictive.com)).

FibroTest byl východiskem pro další matematické modely:

ActiTest pro diagnostiku nekro-inflamatorních změn. Jde o FibroTest navýšený o sérovou aktivitu ALT.

SteatoTest pro diagnostiku jaterní steatózy. Jde Fibrotest navýšený o BMI (body mass index, cholesterol, triglyceridy a glykemii (Poynard 2005).

NASHTest pro diagnostiku nealkoholové steatohepatitidy (Poynard 2006). Jde o FibroTest navýšený o výšku a váhu nemocného a dále o sérové hladiny, triglyceridů, cholesterolu, ALT a AST.

ASHTest pro diagnostiku alkoholové hepatitidy. Jde o FibroTest navýšený o hodnoty sérové aktivity ALT a AST.

Kombinací FibroTestu, ActiTestu, SteatoTestu a ASHTestu vznikl test **FibroMax**.

FibroTest nemá žádnou vypovídající hodnotu v případech u akutních virových hepatitid, u polékové hepatitidy, extrahepatické cholestázy, a těžké hemolýzy. Dále u Gilbertova syndromu s vysokou nekonjugovanou hyperbilirubinemií a u akutních zánětlivých onemocnění. Podle písemnictví je výsledek FibroTestu diagnosticky srovnatelný s bioptickým vzorkem jaterní tkáně o délce 25 mm.

Fib-4

Kombinuje standardní biochemické testy navýšené o počet trombocytů, sérové aktivity ALT a AST a věk nemocného. Jeho výpočet je následující:

$$Fib-4 = \text{věk (roky)} \times AST [U/L] / ((PLT [10^9/L]) \times (ALT [U/L])^{(1/2)}).$$

Test byl užít ve studii s 847 pacienty s chronickou hepatitidou C, u kterých byla provedena jaterní biopsie. Hodnoty obou byly korelovány.

Fib-4 skóre vyšší než 3,25 mělo pozitivní prediktivní hodnotu pro signifikantní fibrózu F3 - F4 v 82,1 %. Skóre nižší než 1,45 mělo negativní prediktivní hodnotu pro vyloučení přítomnosti závažné fibrózy v 94,7 % (Vallet-Pichard 2007). Sterling porovnával výsledky Fib-4 a histologii u pacientů s koinfekcí HCV/HIV. Prokázal, že cut-off hodnoty 1,45 predikují absenci a 3,25 predikují přítomnost signifikantní fibrózy a shledal tento test přínosným pro snížení počtu jaterních biopsií (Sterling 2006).

HepaScore

Tento test je indikován pro vyšetření pacientů s chronickou hepatitidou C. Vychází ze stanovení sérových hladin alfa-2 makroglobulinu (A2M), HA, GGT, celkového bilirubinu a zahrnuje i věk a pohlaví. Výpočet se provádí následujícím způsobem:

$$HS=y/1+y$$

$$y = \exp [-4,185818-(0,0249 \times \text{věk}) + (0,7464 \times \text{pohlaví}) + (1,0039 \times A2M) + (0,032 \times \text{kyselina hyaluronová}) + (0,0691 \times \text{bilirubin}) - (0,0012 \times GGT)]$$

(věk = roky, mužské pohlaví =1, ženské pohlaví=0, A2M v g/l, kyselina hyaluronová (HA) v μ U/l.

HepaScore vyšší než 0,5 vyjadřuje signifikantní fibrózu se 67%-ní sensitivitou a 92%-ní specificitou. Výsledek nižší než 0,5 vylučuje rozvinutou fibrózu se sensitivitou 88% a specificitou 74%. Hodnota větší než 0,84 svědčí pro jaterní cirhózu (Adams 2005). Tento je také jeho autory doporučovaný u alkoholového postižení jater ale nepřináší lepší výsledky než FibroTest (Naveau 2009,Becker 2009).

PGA

Je doporučován pro vyšetření, které detekuje těžší fibrózu u pacientů s alkoholovým onemocněním jater. Zahrnuje protrombinový čas, GGT a apolipoprotein A1. Ve studii souboru 333 osob s alkoholovým postižením jater, kteří podstoupili jaterní biopsii, byly výsledky PGA indexu od 0 do 12. Pokud byl výsledek nižší nebo roven 2, pravděpodobnost cirhózy byla nulová. Pokud byl index vyšší nebo roven 9, byla pravděpodobnost cirhózy 86% (Poynard 1991).

Později byl tento model rozšířen o A2M (alfa2makroglobulin) pro zlepšení diagnostického přínosu.

Fibrofast

Kombinuje jednoduché biochemické parametry, má být určen pro vyšetření pacientů s chronickou hepatitidou C. Dle doporučení Shihy může být vhodnou alternativou jaterní biopsie až u 1/3 pacientů se senzitivitou a specificitou 95%. Jeho výpočet:

$$\text{Fibrofast score} = [\text{Albumin(g/l)} \times 0,3 + \text{PLT}(10^9/\text{l}) \times 0,05] - [\text{ALP(IU/l)} \times 0,014 + \text{AST/ALT ratio} \times 6 + 14]$$

(Shiha 2009, Attallah 2006)

Fibroindex

Sestavil jej Koda studiem souboru 402 pacientů s chronickou hepatitidou C. Vylučovacím kritériem byla koinfekce virem hepatitidy B, HIV, konzumace alkoholu v dávce vyšší než 10g denně. Všichni podstoupili jaterní biopsii, byly porovnány histologické nálezy s výsledky krevních testů, provedenými nejvýše 3 dny před biopsií. Jeho výpočet je následující:

$$\text{Fibroindex} = 1,738 - 0,064(\text{PLT} \times 10^4/\text{mm}^3) + 0,005(\text{AST}[\text{IU/l}]) + 0,463(\text{gamaglobuliny})[\text{g/dl}].$$

(Koda 2007)

FibroMeter

Představuje skupinu krevních testů pro vyšetření stágingu jaterního onemocnění, výsledky těchto sérových testů byly porovnávány ve velkých souborech s výsledkem histologického vyšetření. Bylo definováno několik typů FibroMetru podle etiologie jaterního onemocnění: Pro HCV infekci a duální infekci HCV/HIV zahrnuje věk, A2M, protrombinový čas, PLT, AST, ureu, a HA. Výpočet:

$$\text{FibroMeter} = -0.007 \times \text{PLT}(\text{G/l}) - 0.049 \times \text{protrombinový čas}(\%) + 0.012 \times \text{AST}(\text{UI/ml}) + 0.005 \times \alpha_2 \text{ makroglobulin}(\text{mg/dl}) + 0.021 \times \text{HA}(\text{mg/l}) - 0.270 \times \text{urea}(\text{mmol/l}) + 0.027 \times \text{věk}(\text{roky}) + 3.718,$$

(Lerroy 2007).

Tabulka č. 5

Komerčně poskytované zpracování tzv. Fibrometru dle etiologie onemocnění:

FibroMeters

		Age	Gender	Patient's weight	Alpha 2 macroglobulin	Acide Hyaluronique	Prothrombin time	Platelets	AST	Urea	GGT	Billirubin	ALT	Ferritin	Glucose
FibroMeter V (B or C Virus and co-infection HCV/HIV)	Score of fibrosis	X	X		X		X	X	X	X	X		X		
	Score of cirrhosis	X	X		X		X	X	X	X	X		X		
	Activity				X		X	X					X		
FibroMeter A (Alcohol)	Score of fibrosis	X	X		X	X	X								
	Percentage of fibrosis				X	X	X	X							
FibroMeter S (Metabolic steatosis)	Score of fibrosis	X	X	X				X	X				X	X	X
	Percentage of fibrosis					X	X	X	X				X		X

Nabízí firma BioLiveScale(Francie) www.biols.fr

Test podle Fortunata

Je určen k detekci cirhózy a spočívá na 6 biochemických parametrech: fibronektin, protrombin, pseudocholinesteráza, ALT, Mangan superoxid dismutáza, N-acetyl beta glukosaminidáza (beta NAG).

Cut-off hodnota je 0,22, hodnoty nižší znamenají jaterní cirhózu. Protrombinová aktivita a pseudocholinesteráza představují markery syntetické aktivity jater, beta NAG a fibronektin patří mezi přímé markery fibrózy. Vzestup beta NAG u cirhotiků odráží akumulaci kolagenu.

Výpočet testu:

$$Skore = PCHE(\mu kat/l) \times 0,00011 + fibronektin(mg/l) \times 0,039 + Ln \text{ protrombin}(\%) \times 3,51 + ln ALT(\mu kat/l) \times 0,49 - ln \text{ beta NAG}(\mu kat/l) \times 0,51 - ln MnSOD(\mu kat/l) \times 1,29 - 9,41$$

(Fortunato 2001)

Patel test

Autor sestavil matematický model, využívající sérové hodnoty HA, TIMP-1 a A2M, remodelující extracelulární matrix. Ve studii s tímto testem na souboru 402 nemocných s chronickou hepatitidou C byli odlišeni nemocní s žádnou nebo mírnou fibrózou (F0-F1) od nemocných se střední nebo těžkou fibrózou (F2-F4). (Patel 2004). Test je nabízen firmou Prometheus Laboratories k diagnostice jaterní fibrózy.

ELF Test (Enhanced Liver Fibrosis Test)

Původně byl užíván k vyšetření fibrózy u pacientů s alkoholovým postižením jater nebo u NASH a jako jednu z veličin zahrnoval i věk. Později začal být užíván k vyšetření fibrózy u pacientů s chronickou hepatitidou C.

ELF Test vychází ze stanovení HA, MMP-1 a N-terminálního propeptidu kolagenu typu III .
Výsledky jsou srovnatelné s FibroTestem (Friedrich-Rust 2010)

ELFGA (European Liver Fibrosis Group Algorithm)

Test vychází z markerů I. třídy a zahrnuje věk nemocného, N-terminální propeptid kolagenu typu III, haptoglobin a TIMP.
(Rosenberg 2004).

Bonacini Test - Cirrhosis diskriminant Score - (CDS)

Autorem CDS je Bonacini. Komponentami testu jsou počet trombocytů, poměr ALT/AST a protrombinový čas. CDS 8 a vyšší má 46% senzitivitu a 98% specifitu pro jaterní fibrózu F3-F4.(Bonacini 1994).

Výpočet testu:

CDS *Trombocyty* ($\times 10^9/L$): $>340 = 0$; $280-339 = 1$; $220-279 = 2$; $160-219 = 3$; $100-159 = 4$;
 $40-99 = 5$; $<40 = 6$

ALT/AST ratio: $>1.7 = 0$; $1.2-1.7 = 1$; $0.6-1.19 = 2$; $<0.6 = 3$

INR: $<1.1 = 0$; $1.1-1.4 = 1$; $>1.4 = 2$

CDS je součtem výše uvedených výsledků(možné hodnoty 0-11).

AP index věk (roky): <30 = 0; 30–39 = 1; 40–49 = 2; 50–59 = 3; 60–69 = 4; ≥70 = 5

Trombocyty (×10⁹/L): ≥225 = 0; 200–224 = 1; 175–199 = 2; 150–174 = 3;

125–149 = 4; <125 = 5

AP je součtem výše uvedených výsledků(možné výsledky 0–10).

AP index 6 a vyšší je signifikantní pro pokročilou fibrózu.

(Lackner 2005)

SHASTA index

Byl sestaven Kelleherem pro studium fibrózy na souboru 95 pacientů s duální infekcí HCV/HIV.

Vychází ze stanovení HA, AST a albuminu. Podle autora je stejně přínosný jako FibroTest a APRI test, je schopen spolehlivě identifikovat pokročilou fibrózu.

(Kelleher 2005)

LiverScore

Index, byl publikován pakistánskými a saudskoarabskými autory v roce 2011. Vychází z naléhavé potřeby zmíněných zemí reagovat na narůstající počet pacientů s chronickou hepatitidou C, u kterých je nutné se rozhodnout, kdo podstoupí finančně náročnou léčbu. Test původně obsahoval 9 parametrů; věk, pohlaví, celkový bilirubin, ALT, GGT, A2M apolipoprotein A1(apoA1), hydroxyprolin (HYP) a HA. Postupně byly vypuštěny bilirubin, pohlaví a hydroxyprolin.

Vyšetření HYP je drahé a málo dostupné ve většině laboratoří, vynechání bilirubinu a pohlaví přineslo zásadnější rozdíly ve výsledcích, které odpovídají jednotlivým stupňům fibrózy.

V konečné podobě má Liverscore tento tvar:

$$\text{Liverscore} = -1,578 + 0,018(\text{věk}) + 0,023(\text{ALT}) + 0,021(\text{GGT}) + 0,152(\text{A2M}) - 0,015(\text{ApoA1}) + 0,014(\text{HA})$$

ALT a GGT jsou vyjádřeny v U/L, A2M v g/L, apoA1 v mg/dL, a HA v µg/mL.

Výsledky byly porovnány se stupněm fibrózy zjištěným histologicky.

Výsledek LiverScore 0,40 a nižší vylučuje přítomnost signifikantní fibrózy. Výsledek vyšší než 0,8 znamená přítomnost významné fibrózy F2-F4.

(Shoukat 2011)

HALT-C

jde o test, který kombinuje HA, TIMP-1 a trombocyty. Jde o test, který má odrážet obrat extracelulární masy. V predikci fibrózy a cirhózy je prezentován jako přínosnější než vyšetření CDS, YKL-40, PIIINP (Fontana 2008).

Fibrosis Probability Index(FPI)

má parametry věk, poslední konzumace alkoholu, AST, cholesterol a parametr insulinové rezistence HOMA-IR (Sud 2004).

ViraHep-C

Jeho parametry jsou věk, AST, trombocyty a ALP.

V porovnání s APRI, AST/ALT, CDS, a AP indexem se jeví jako lepší, zahrnuje v sobě většinu parametrů obsažených ve zmíněných modelech (Fontana 2006).

Goteborg University Cirrhosis Index (GUCI)

zahrnuje AST, INR a trombocyty. Skóre je určeno k detekci pacientů s jaterní cirhózou (Islam 2005).

V tabulce č. 6 jsou uvedeny rutinní testy jaterní fibrózy, jejich senzitivita, specificita a příčiny jaterního poškození (Gressner AM 2009). V tabulce č. 7 je uveden přínos některých rutinních testů pro diagnostiku fibrózy (Mastera 2011) a v tabulce č. 8 přínos některých rutinních testů pro diagnostiku cirhózy u nemocných chronickou HCV infekcí (Castera 2011).

Tabulka č. 6

Index Score	Parameters	Disease	Senzitivity %	Specificity %
PGAA	Prothrombin time, GGT, apolipoprotein A1, alfa-2-macroglobulin	Alcohol	79	89
Bonacini	Ratio ALT/AST, INR, platelet count	HCV	46	98
De Ritus	Ratio AST/ALT	HCV	53	100
PGA	Prothrombin time, GGT, apolipoprotein A1	Mixed	91	81
Fortunato	Fibronectin, prothrombin time, PCHE, ALT, Mn-SOD, beta-NAG	HCV		94
FibroTest	Haptoglobin, alfa-2-macroglobulin, apolipoprotein, A1, GGT, bilirubin	HCV, HBV	75	85
Pohl	Ratio AST/ALT, platelet count	HCV	41	99
ActiTest	Fibrotest + ALT	HCV		
Forns	Age, platelet count, GGT, cholesterol	HCV	94	51
WAI (APRI)	AST, ALP, platelet count	HCV	89	75
Rosenberg ELF-test	PIIINP, hyaluronic acid, TIMP-1	Mixed	90	41
Patel	Hyaluronic acid, TIMP-1, alfa-2-macroglobulin	HCV	77	73
Sud (fibrosis probability index, FPI)	Age, AST, cholesterol, insulin resistance (HOMA), past alcohol intake	HCV	96	44
Leroy	PIIINP, MMP-1	HCV	60	92
Fibrometer	Platelet count, prothrombin index, AST, alfa-2-macroglobulin, hyaluronic acid, urea, age	Mixed	81	84
HepaScore	Bilirubin, GGT, alfa-2-macroglobulin, hyaluronic acid, age, tender	HCV	63	89
Testa	Ratio platelet count/spleen diameter	HCV	78	79
FIB-4	Platelet count, AST, ALT, age	HCV, HIV	70	74

Rutinní testy jaterní fibrózy, jejich parametry, specificita, senzitivita a příčiny jaterního poškození. Podle Gressner AM. 2009.

Tabulka č. 7

Test	Rok	Pacienti	Signifikantní fibróza	Cutoff
FibroTest	2001	339	80%	>0,48
Forns Index	2002	476	26%	<4,2>6,9
APRI	2003	270	50%	≤0,5>1,5
FibroSpect	2004	696	52%	>0,36
ELF	2004	1021	40%	NA
FPI	2005	302	48%	<0,2≥0,8
Hepascore	2005	211	57%	≥0,5
Fibrometer	2005	598	56%	NA
ViraHep-C	2006	859	37%	≤0,22>0,55
Fibroindex	2007	360	50%	≤1,25≥2,25

Přínos některých rutinních sérových testů pro diagnostiku signifikantní jaterní fibrózu (Castera 2011)

NA-výsledky nejsou k dispozici

U ELF testu se jedná o soubor pacientů s chronickou HCV infekcí

Tabulka č. 8

Test	Rok	Pacienti	Cirhóza	Cut off
FibroTest	2001	1 197	14 %	>0,74
APRI	2003	476	17 %	<1,0≥2,0
ELF	2004	1 021	NA	NA
Hepascore	2005	211	16 %	>0,84
GUCI	2005	179	12%	>1,0
HALT-C	2008	512	38%	<0,2>0,5

Přínos některých rutinních sérových testů pro diagnostiku cirhózy u pacientů s chronickou HCV infekcí (Castera ,2011).

NA- výsledky nejsou k dispozici

2.3 . Kvantifikace jaterních funkcí - dechové testy

Snaha o kvantifikaci jaterních funkcí provází hepatologii více než 50 roků. Dříve byly velmi populární chromoexkreční testy. Dnes se prakticky neprovádí. Bromsulfoftaleinový retenční test se neprovádí vůbec pro občasné alergické reakce i dokonce s fatálním průběhem. Opuštěny byly i metody testování metabolických jaterních funkcí po podání antipyrinu či aminopyrinu značeného uhlíkem ^{14}C . V současné době se považuje za nejvýhodnější testy s ^{13}C značenými substráty, nejlépe methacetinem.

Základem kvantifikace metabolických funkcí jater jsou tedy dnes dechové testy s neradioaktivním isotopem uhlíku C^{13} vázané na různé substráty: aminopyrin, fenylalanin, methacetin, galaktózu. Neradioaktivní stabilní izotop uhlíku ^{13}C se běžně vyskytuje v přírodě a jeho užití pro dechové testy znamená nejnovější vývoj v testování jaterních funkcí, i když jeho využití v gastroenterologii je mnohem širší.

U metabolizovaného substrátu značeného ^{13}C je $^{13}\text{CO}_2$ exhalovaný v dechu měřítkem rychlosti a účinnosti procesu metabolismu. Nemocný vydechuje v určitých intervalech do speciálních sáčků, jejichž obsah je pak analyzován infračerveným spektroskopem. Přístroj stanovuje poměr $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$.

Jedním z nejčastěji používaných je ^{13}C methacetinový dechový test.

Methacetin je derivát fenacetinu. Je metabolizován CYP450 na CO_2 a acetaminofen. Měří jaterní demetylaci (Hamizah 2011).

Po perorálním podání substrátu v dávce 2mg/kg váhy se provádí měření po dobu 2 hodin v intervalech co 10 minut. Cut-off hodnota cPDR (kumulativní výdej) ve 120 minutách je 25%. Senzitivita a specificita testu pro diagnózu jaterní cirhózy je 93,5% respekt. 95%.

Ve srovnání s ostatními substráty značenými C^{13} je methacetin metabolizován rychleji a je levnější.

Podle nedávných studií ^{13}C MBT (^{13}C Methacetin Breath Test) lze spolehlivě odlišit zdravé jedince od pacientů s cirhózou. Jeho spolehlivost pro určení jaterní fibrózy má být srovnatelná se sérovými testy APRI a FibroIndexem. Dechový test s ^{13}C methacetinem je schopen dle všech referencí spolehlivě určit pokročilou jaterní fibrózu a cirhózu, není ale zatím použitelný pro určení jednotlivých stadií fibrózy (Dinesen 2008).

Vhodnou kombinací pro funkční posouzení cirhózy může být C^{13} galaktóza a C^{13} aminopyrin. Dechový test s podáním ^{13}C fenylalaninu (10 mg/kg váhy) významně koreluje s histologicky ověřeným stupněm jaterní fibrózy. Nevýhodou dechových testů je značná počáteční investice představovaná nákupem přístroje a nutnost spolupráce nemocného.

2.4. Zobrazovací vyšetřovací metody

2.4.1. Ultrasonografie (USG)

Sonografické vyšetření se v klinické praxi užívá již více než 50 roků a v diagnostice hepatobiliárních onemocnění je zobrazovací metodou první volby.

Při USG ve vztahu k fibróze nebo jaterní cirhóze se hodnotí echogenita, uzlová přestavba, povrch jater, šíře v. portae, přítomnost ascitu a velikost sleziny. Zásadní změny v USG obraze jsou popisovány až u pokročilé fibrózy nebo jaterní cirhózy (Aubé 1999).

Poměr transversálního rozměru lobus caudatus a pravého jaterního laloku byl již před 30 lety užít k odlišení nemocných s cirhózou od nemocných s necirhotickým onemocněním jater (Harbin 1980).

Snaha využít ultrazvuk k neinvazivnímu vyšetření jaterní fibrózy pokračuje užitím modernějších sonografických postupů, kontrastní ultrasonografie a kombinací výsledků USG s výsledky laboratorních vyšetření.

Kontrastní ultrazvukové vyšetření jaterních cév a parenchymu (CEUS) se provádí po i.v. aplikaci kontrastní látky s mikrobublinami „Levovist SonoVue“. Levovist patří k první generaci kontrastních látek, jde o bublinky vzduchu v obalu z kyseliny palmitové. SonoVue reprezentuje druhou generaci echokontrastních látek, obsahuje plyn hexafluorid síry ve fosfolipidové slupce. Bublinky se rozkmitají pomocí ultrazvukového signálu vysílaného sondou do jater, prasknou a tím zvýrazní signál. Druhá generace vydrží v cévním řečišti déle, poločas je 6 hodin.

Hodnocení fibrózy vychází ze sledování maxima signálu v jaterním parenchymu, a. hepatica, v. portae a v pravé jaterní žíle a ze stanovení transitních časů (hepatic vein transit time [HVTT]) tj. mezi jaterní tepnou a jaterní žílou (HA-HVTT) a mezi v. portae a jaterní žílou (PV-HVTT). Výsledky vyšetření kontrastní sonografií byly porovnány s histologickými nálezy u pacientů s hepatitidou B a bylo zjištěno, že s narůstajícím stupněm fibrózy se postupně zkracuje HVTT. CEUS je tedy metodou, která je schopna detekovat jaterní fibrózu a cirhózu, rozlišit mezi mírnou a závažnou fibrózou (Iacobellis 2005).

PLT/průměr sleziny

Pro zpřesnění neinvazivního stanovení přítomnosti jaterní fibrózy a odhadu jejího stupně se jako přínosné jeví vyšetření poměru počtu trombocytů a maximálního bipolárního rozměru sleziny(mm). Testa ve studii z roku 2006 na souboru nemocných chronickou hepatitidou C

prokázal, že stanovení PLT/průměr sleziny signifikantně odráží fibrózu stadia F2-F4. Tento test se jeví stejně přínosný v diagnostice jaterní fibrózy jako dechový test s ¹³C methacetinem nebo APRI index (Testa 2006).

2.4.2 Měření tuhosti jater

2.4.2.1. Fibroscan – transienční elastografie (TE)

Elastografie pomocí Fibroscanu je neinvazivní metoda vyšetření jaterní fibrózy, založená na měření tuhosti jaterní tkáně. Fibroscanem je vyšetřen okrsek jaterní tkáně odpovídající tvarem válci o průměru 1cm a délce 4cm. Objem vyšetřené tkáně je tedy asi 100x větší než objem tkáně získané jaterní biopsií.

Fibroscan je vybaven sondou spojenou s vibrátorem, vysílajícím vibrace o frekvenci 50MHz. Vibrace přenášené na jaterní tkáň vyvolávají elastické vlny, které se šíří v játrech. Měřená je rychlost šíření příčné vlny v jaterní tkáni. Rychlost propagace vlny je definována Youngovým modulem pružnosti a vyjádřena v kPa a koreluje se stupněm elasticity či tuhosti jaterní tkáně. S narůstající tuhostí jater stoupá rychlost šíření vln.

Při vyšetření se sonda přikládá do mezižebří (6.-8. mezižebří vpravo), mělo by jít o stejné místo, které by vyšetřující volil k provedení jaterní biopsie. Vyšetřovaný okrsek jater je homogenní, začíná 25-65mm pod kožním povrchem a neměl by obsahovat cévy o průsvitu větším než 5 mm.

Po správném přiložení sondy je provedeno 10 měření a konečný výsledek je mediánem všech deseti měření a je uváděn v kPa. V mnoha studiích byly porovnány výsledky elastogramů a stagingu fibrozy popsaného histopatologem. Výsledky studie Fridrich-Rusta jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9

Stadium	Cutt off
METAVIR	kPa
F0	5,5±1,6
≥F2	7,8-8,8
≥F3	9,6-12,5
F4	12,5-17,6

Porovnání histologicky vyjádřeného stupně fibrózy s výsledky elastogramu (Friedrich-Rust et al. Gastroenterology 2008)

Transientní elastografie se provádí přístrojem Fibroscan francouzské firmy Echosens nebo přístrojem SonoElastography (Hitachi Medical Systems). Je doporučována u celé řady chronických jaterních onemocnění, nejčastěji u chronických virových hepatitid. Z publikovaných studií vyplývá, že je obtížné touto metodou diferencovat mírnou fibrózu, spolehlivě však určí signifikantní fibrózu a cirhózu.

U nemocných s chronickou hepatitidou C a časným stadiem fibrózy byla popsána větší shoda mezi histologickým nálezem a elastogramem než mezi histologií a FibroTestem (Colleta 2005).

Užití Fibroscanu má i omezení. U obézních pacientů s $BMI > 28 \text{ kg/m}^2$ může velká vzdálenost mezi játry a povrchem zkreslit výsledky. Pro tyto případy je zaváděna do praxe nová tzv. XL sonda, určená pro obézní nemocné.

Ascites je také překážkou pro vyšetření transientní elastografie, protože mění prostředí pro přenos vln.

Jaterní elasticitu ovlivňuje rovněž městnání krve v játrech a cholestáza, způsobená obstrukcí žlučových cest. Také akutní hepatitida může být příčinou falešně pozitivních výsledků.

Fibroscan i přes své výhody nemůže nahradit jaterní biopsii, nepřispěje k stanovení gradingu jaterního onemocnění a k průkazu steatózy a komorbidit (Lu 2010).

Má však své místo ve vyšetřovacím algoritmu na vyspělých hepatologických pracovištích. Jeho výhodou je zejména jednoduché provedení, neinvazivní přístup a snadná opakovatelnost. Na obrázku 4 je sonda-fibroscan. Na obrázku č. 5 je vlastní přístroj a schéma provádění elastografie je na obrázku č. 6. (Sandrin 2010).

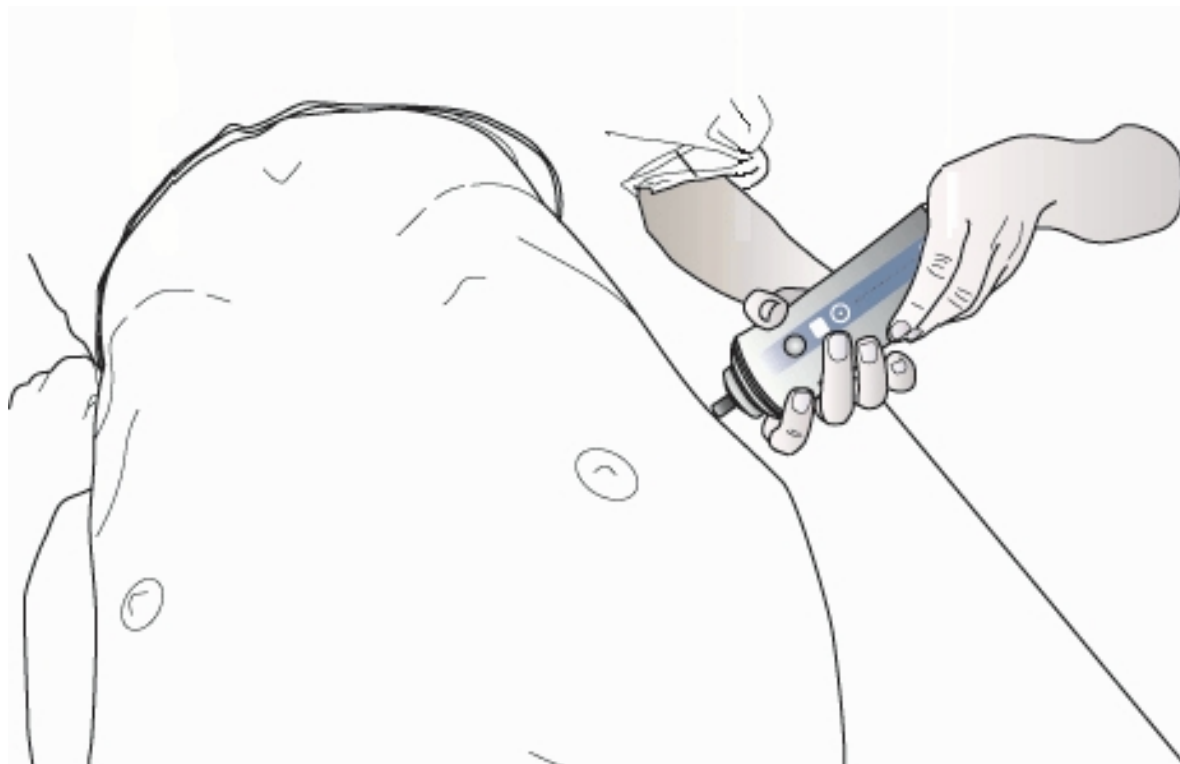
Obr.č. 4



Obr. č. 5



Obr. č.6



2.4.2.2. Real Time Elastography (RTE)

Jde o metodu technicky odlišnou od transientní elastografie. Poskytuje barevný dvourozměrný obraz vyšetřované tkáně, k vyšetření jsou užívány ultrazvukové přístroje firmy Hitachi (Taimr 2007). Sleduje ultrazvukové impulsy při působení tlaku na jaterní tkáň. RTE byla původně zavedena k vyšetření ložiskových lézí prsu, pankreatu a prostaty. V roce 2007 publikoval Friedrich-Rust poznatky o využití RTE při vyšetření jater.

Při ultrazvukovém vyšetření jsou registrovány echosignály před a po působení tlaku pomocí tzv. kombinované autokumulativní metody je vypočtena relativní tvrdost tkáně. Výsledek je vizualizován v šedé nebo barevné škále, při měření tvrdosti je udáván v kPa. Při barevném zobrazení jsou popisovány 3 základní obrazy. Difúzní měkký obraz (světle zelený) odpovídá normální jaterní tkáni nebo játrům s mírnou fibrózou. Těžké fibróze a cirhóze odpovídá tvrdý skvrnitý obraz, kde převládají modře zbarvené okrsky.

Vyšetřovací sonda se přikládá stejně jako při vyšetření Fibroscanem na místo, které by bylo zvoleno pro provedení jaterní biopsie, opět musí být zaměřena oblast bez velkých cév. Měření

okrsek má tvar obdélníku 30 mm délky a 20 mm šířky, většinou 5-10 mm pod povrchem jater. Dosah vyšetření je omezen do 10 cm od povrchu těla (Morikawa 2011)

RTE však nedosáhla tak velkého uplatnění jako transientní elastografie.

2.4.2.3 Acoustic Radiation Force Impuls Elastography (ARFIE)

Jde o zobrazovací metodu využívající mechanickou energii ultrazvukových vln.

K vyšetření je užíván standartní ultrazvukový přístroj (AcusonS2000 Siemens), který je doplněn o technologii Virtual Touch Tissue Imaging a Virtual Touch Tissue Quantification. Tyto softwary umožňují kvalitativní a kvantitativní hodnocení elasticity jaterní tkáně. Vysílány jsou vlny 3,5MHz. Impulzy vzniklé šířením vlny v jaterní tkáni jsou užity k měření rychlosti šíření vln. Rychlost narůstá přímo úměrně s tuhostí tkáně.

Měření se provádí nad pravým lalokem jaterním z interkostálního přístupu u pacienta ležícího na zádech. Je vyšetřována oblast v hloubce 2-3 cm pod jaterním pouzdrem. K vyšetření by měl být vybrán okrsek bez cév většího průsvitu. Ze studií, které porovnávají měření ARFIE a stupeň fibrózy při histologickém vyšetření u pacientů s chronickou hepatitidou C vyplývá, že přesnost ARFIE je srovnatelná s TE při detekci závažných stadií fibrózy (F3,F4), je horší při detekci mírnějších stadií (F1,F2). Cut-off hodnota pro odlišení jaterní cirhózy je podle různých zdrojů 1,6-1,95 m/s (Palmeri 2011).

Výhodou ARFIE ve srovnání s TE je možnost anatomického zobrazení, detekce isoechogenních lézí a menší limitace ascitem nebo obezitou. U obézních lidí byla popsána menší úspěšnost měření (58%) až při BMI >40kg/m² (58%). Dosah vyšetření do hloubky je 5,5cm. Nemusí být vždy striktně dodržen interkostální přístup vpravo, je možné i vyšetření levého jaterního laloku ze subkostálního přístupu při poloze na levém boku (Braticevici 2011).

2.4.3. Magnetická rezonance (MR)

Uplatnění magnetické rezonance, zejména novějších postupů v diagnostice jaterní fibrózy je poměrně široké. Běžně užívané vyšetření MR spolehlivě identifikuje jaterní cirhózu, ale není přínosem pro zjištění časných stadií fibrózy. Užití kontrastních látek jako gadolinium zásadně zlepšuje odlišení fokálních lézí.

Přesnějších výsledků vyšetření pokročilé jaterní fibrózy metodou MR se dosáhlo užitím kombinace kontrastních látek gadolinia a superparamagnetického oxidu železa (SPIO). Shoda s histopatologickými nálezy byla ve více než 90% (Aguirre 2006).

Obě kontrastní látky působí synergicky při zobrazení retikulací a nodulární přestavby Gadolinium je akumulováno v extracelulárních prostorech fibrosní hmoty, SPIO se akumuluje v Kupfferových buňkách a navíc ztmaví obraz jaterního parenchymu v pozadí. Vyšetření má i nevýhody. Poměrně vysoká cena a mohou se objevit i nežádoucí účinky po aplikaci SPIO tj. bolesti v zádech a bolesti dolních končetin (Faria 2009).

2.4.3.1. Diffusion weighted magnetic resonance imaging (DWI MR)

Jeví se využitelná pro diagnostiku jaterní fibrózy, byla popsána korelace mezi jednotlivými stadii fibrózy jater a výsledkem DWI MR. Nález zjištěný vyšetřením DWI MR je vyjádřen jako Apparent Diffusion Coefficient (ADC). Jednotkou ADC je sec/mm^2 . Pacienti s jaterní cirhózou nebo pokročilou fibrózou mají ADC nižší než zdraví jedinci, protože s progresí fibrózy v játrech dochází k restrikci difúze vody v játrech (Taouli 2007).

DWI MR je schopna prokázat signifikantní fibrózu. Výsledky dosažené tímto vyšetřením jsou srovnatelné s výsledky rutinních sérových testů APRI, Fornsova indexu a FibroTestu (Lewin 2007).

V praktické hepatologii však DWI MR nedosáhla zatím významnějšího uplatnění.

2.4.3.2 MR elastografie (MRE)

Ke standardnímu vyšetření jater magnetickou rezonancí je často připojeno vyšetření elastografie. Ta je i případně MRE, stejně jako při ultrazvukovém vyšetření, založena na šíření příčných vln játry. Vlny mají frekvenci 40-120 Hz a jsou generovány zařízením přiloženým na břicho pacienta. Rychlost pohybu mechanické vlny je zobrazena metodou fázového kontrastu. Zobrazeno je rozložení fibrotických změn v celých játrech, rychlost šíření vln je měřena ve 3 rovinách. Celkový výsledek vyšetření obdrží vyšetřující jako elastogram, elasticita je vyjádřena v kPa (Rouviere 2006).

Vyšetření trvá 60 minut, může být užito i u obézních nemocných. MRE vykazuje, že pacienti s jaterní fibrózou mají vyšší hodnotu tuhosti jater než zdraví dobrovolníci. Rozdíly v naměřené tuhosti u pacientů s mírnou fibrózou nebo bez fibrózy (F0 vs. F1 vs. F2) jsou nepatrné a často se překrývají. U nemocných s vyššími stupni fibrózy (F2 vs. F3 vs. F4) jsou rozdíly mezi skupinami významné a případné překrývání minimální.

MRE představuje slibnou metodu detekce vyšších stadií fibrózy.

Podle studie Huwarta z roku 2008 je MRE v diagnostice jaterní fibrózy přesnější než transientní elastografie. U nemocných s histologickým nálezem stagingu F0-F1 byly hodnoty

elasticity $2,24 \pm 0,23$ kPa, u nemocných s fibrózou F2-F3 byly zjištěny hodnoty $2,56 \pm 0,24$ kPa a u pacientů s F4 byly zjištěny hodnoty $4,68 \pm 1,61$ kPa (Husary 2008).

Při srovnání obou způsobů vyšetření elastografie tj. TE a MRE byly nalezeny výhody i nevýhody. Jako výhodný se u MRE jeví fakt, že je úplně nezávislá na vyšetřujícím odborníkovi, který volí okrsek vyšetřování a mohou být vyšetřováni i obézní nemocní (Husary 2008).

2.4.3.3. Magnetická spektroskopie (MRS)

Protonová magnetická spektroskopie identifikuje řadu metabolitů, jejichž koncentrace a složení se mění u jaterní steatózy a fibrózy (Friedrich –Rust 2010).

Fosforová magnetická spektroskopie jater pomocí MRS neinvazivně zachycuje změny parenchymu a odliší cirhotická játra od precirhotických stadií. Poměr fosfomonoesterů a fosfodiesterů (PME/PDE ratio) je indexem aktivity buněčných membrán a koreluje se stupněm poškození jaterní tkáně vyjádřené Childovým-Pughovým skóre. Zvýšení indexu bylo sledováno u jaterní cirhózy, je vysvětlováno zvýšenou regenerační aktivitou.

2.4.4. Počítačová tomografie (CT)

CT diagnostikuje podle uzlovité přestavby jaterní cirhózu, dokud se ještě nemanifestovaly projevy portální hypertenze. Hlavním přínosem je diagnostika ložiskových lézí a změn v. portae.

Běžně se CT neuzívá k hodnocení stupňů jaterní fibrózy, i když jsou popsány možnosti využití kontrastního CT k tomuto hodnocení. Ve studii Ronota z roku 2010 je porovnávána perfúze jater v ml/min s histologickými nálezy. U pacientů s fibrózou F2-3 byly perfúzní parametry nižší ve srovnání s nemocnými s F0-F1 (Sandrin 2010).

3. Vlastní práce

3. 1. Cíle doktorské disertační práce

a. Primární cíle.

- a. V prospektivní studii na souboru 74 naivních nemocných s chronickou hepatitidou C prokázat citlivost neinvazivního vyšetření jaterní fibrózy pomocí vybraných sérových testů v korelaci se stupněm jaterní fibrózy prokázaným histologickým vyšetřením vzorků jaterní tkáně získaných necílenou perkutánní jaterní biopsií
- b. Srovnat docílené výsledky s pozorováním jiných zahraničních autorů. U nás v ČR studie tohoto typu provedena nebyla.
- c. Zjistit, zda kouření cigaret ovlivňuje jaterní fibrózu, zda faktor kouření mění senzitivitu sérových testů fibrózy. Kouření cigaret představuje zatím málo prostudovaný faktor progresu chronické virové hepatitidy C. V žádném námi dostupném sérovém markeru jaterní fibrózy není tento faktor obsažen.

b. Sekundární cíle.

- a. Zjistit histologicky verifikovaný stupeň jaterní fibrózy u naivních nemocných s chronickou hepatitidou C před zahájením kombinovanou léčbou interferonem a ribavirinem.
- b. Zjistit vztah histologicky verifikovaného stupně jaterní fibrózy k terapeutickému výsledku - tedy dosažení SVR.
- c. Zjistit vztahy mezi stupněm jaterní fibrózy prokázaným histologicky, věkem a předchozí drogovou závislostí nemocných s chronickou hepatitidou C. Jde o to, že přenos infekce virem hepatitidy C je nejčastěji při parenterální aplikaci

drogy a někdejší toxikomani představují valnou část klientely pracovišť zabývajících se léčbou chronické hepatitidy C.

3.2. Metodika a soubor nemocných

3.2.1. Soubor nemocných:

Od ledna 2006 do června 2011 bylo v hepatologické poradně II. interní kliniky-gastroenterologické a hepatologické Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci vyšetřeno 98 nemocných s chronickou infekcí virem hepatitidy C. Do poradny byli posláni ke zvážení protivirové kombinované léčby pegylovaným interferonem a ribavirinem. Z nich do této doktorské disertační studie bylo zařazeno 74. Všichni splnili vstupní kritéria, tj. všichni byli naivní pacienti s chronickou virovou hepatidou C, splňovali kritéria ČHS pro kombinovanou léčbu pegylovaným interferonem a ribavirinem a v informovaném souhlasu akceptovali provedení jaterní biopsie a souhlasili s odběrem krve k vyšetření serologických markerů (testů) jaterní fibrózy. Soubor tvořilo 43 mužů (58.1 %) a 31 žen (41.9 %). Průměrný věk nemocných v době vstupu do studie byl 33.45 roků (19 – 61 roků).

Epidemiologická charakteristika souboru:

- Nejčastější cestou přenosu HCV infekce byla intravenózní toxikomanie. Byla prokázána u 44 pacientů (59.46 %). V době zařazení do studie však již všichni alespoň půl roku abstinovali.
- Přenos HCV infekce sexuální cestou jsme považovali za nejpravděpodobnější u 4 nemocných (5.4 %), jednak přiznali sexuální styk s HCV pozitivním partnerem, a také proto, že jiný rizikový faktor přenosu jsme nezjistili.
- O potransfúzní hepatitidu C šlo u 3 nemocných (4.05 %). Krevní deriváty dostávali v období do roku 1992.
- Iatrogenní přenos HCV infekce, tedy profesionální expozice, se jeví jako jediný rizikový faktor přenosu u 6 osob (8.1 %). Žádný však z oněch šesti zdravotníků si nebyl vědom poranění jehlou či nástrojem.
- U dvou osob (2.7 %) byla provedena tetováž za neprofesionálních podmínek.

- Chirurgický výkon, bez krevního převodu, se jevil jako jediná možná cesta přenosu HCV nákazy u 7 pacientů (9.45 %).
- Jeden pacient (1.35 %) měl provedenou suturu tržné rány při pobytu v Africe.
- ❖ V celém souboru jsou 3 diabetici, všichni I. typu (4.05 %), u 4 osob (5.4 %) byl v anamnéze větší abusus alkoholu, nicméně v době randomizace alespoň 6 měsíců abstinovali.
- ❖ Kuřáků cigaret bylo v souboru 41 (55.4 %). Jde o aktivní kuřáky nebo jedince, kteří dříve roky kouřili.
- ❖ Do souboru nebyli zařazeni pacienti, kteří nesouhlasili nebo nesplňovali vstupní kritéria a také hemofilici, u kterých je infekce HCV poměrně častá, a dále nemocní s koinfekcí VHB ev. HIV.
- ❖ Všichni pacienti byli z hlediska léčby tzv. naivní, doposavad neléčeni interferonem (pegylovaným či konvenčním) a ribavirinem.
- ❖ U žádného pacienta se nevyskytly extrahepatické projevy HCV infekce, nebyly zjištěny nálezy svědčící pro hepatocelulární karcinom.

3.2.2 .Metodika

Všechna klinická vyšetření, laboratorní vyšetření ke stanovení diagnózy chronické hepatitidy C, laboratorní vyšetření nutná ke stanovení serologických markerů jaterní fibrózy, abdominální sonografie a jaterní biopsie byla provedena v prvním týdnu po zařazení do studie. Následně po zahájení kombinované léčby INF alfa a ribavirinem byli všichni nemocní klinicky sledováni a laboratorně monitorováni podle doporučených postupů ČHS pro léčbu chronické hepatitidy C. U všech byla vyhodnocena úspěšnost léčby.

Diagnóza chronické infekce virem hepatitidy C

Byla provedena na základě biochemického vyšetření, především transamináz ALT a AST, dále vyšetřením serologickým, tj. průkazem protilátek anti-HCV třídy IgG a metodami molekulárně genetickými ,tj. kvalitativním a kvantitativním stanovením HCV RNA metodou PCR a vyšetřením genotypů HCV.

HCV RNA byla stanovena metodou RT PCR TaqMan Roche na Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky Fakultní nemocnice v Olomouci

Všichni nemocní tj. všech 74 osob mělo pozitivní protilátky anti-HCV a pozitivní HCV RNA.

Viremie ve vyšetřovaném souboru byla $3,33 \times 10^5$ IU/ml a více, nejvyšší viremie byly $> 7 \times 10^5$. U všech sledovaných nemocných byl zjištěn genotyp Ia a Ib. Genotyp Ia v počtu 34 pacientů, tj. 45 %, genotyp Ib v počtu 41 pacientů, tj. 55 %. Genotypy byly vyšetřeny v laboratořích mimo Fakultní nemocnici Olomouc, využili jsme služeb Aliatros Praha a P&R Lab a.s. v Novém Jičíně.

Koinfekce s HBV byla u všech nemocných vyloučena vyšetřením HBsAg. U pacientů s anamnesou drogové závislosti nebo rizikového sexuálního chování bylo provedeno vyšetření protilátek HIV 1+2. Ve všech případech s negativním nálezem.

Z hlediska léčby byli všichni pacienti tzv. naivní, tj. doposud neléčení interferonem (pegylovaným či konvenčním) a ribavirinem.

Všichni nemocní splňovali kritéria pro zahájení léčby chronické hepatitidy C interferonem a ribavirinem tak, jak jsou stanoveny v doporučených postupech ČHS. U žádného pacienta se nevyskytly mimojaterní projevy HCV infekce. Hepatocelulární karcinom byl vyloučen ultrasonografií jater a vyšetřením krevní hladiny alfa-fetoproteinu.

Abdominální ultrasonografie

U všech nemocných studovaného souboru byla provedena abdominální sonografie k posouzení echogenity jater, přítomnosti ložiskových změn, vyšetření žlučníku, žlučových cest, sleziny a popsána šíře v. portae. Vyšetření provádělo několik zkušených sonografistů, nicméně k posouzení fibrózy nebo dokonce k jejímu stupni se nevyjadřovali a pokud ano, výsledky nálezů nebyly do této studie zavzaty.

Jaterní biopsie

Po zhodnocení koagulačních parametrů, počtu trombocytů a ultrazvukového nálezu byla provedena jaterní biopsie. Šlo většinou o necílenou biopsii, provedenou interkostální cestou. Biopsiováno bylo všech 74 pacientů zařazených do studie. Průměrná délka biopsického vzorku byla 1,8 cm. Všechny biopsické vzorky byly patologem posouzeny jako reprezentativní ke gradingu a stagingu chronické hepatitidy C. Vzorky odečítali patologové specializující se na hepatologii. Prováděno bylo jen jedno čtení. Autorka disertační práce byla zvaná k nahlédnutí histologických nálezů.

Všechna histologická vyšetření byla provedena na Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty UP a FN v Olomouci.

Hodnocení stagingu a gradingu chronické hepatitidy C bylo jednotné, dle Battse a Ludwiga.

Na základě histologicky zjištěného stupně fibrózy byly vymezeny 2 skupiny:

- pacienti bez fibrotických změn nebo jen s minimální fibrózou-F0-F1
- pacienti se signifikantní fibrózou F2-F4

Ve skupině F0-F1 bylo celkem 57 osob (77%), 34 mužů (59,6%) a 23 žen (40,4%).

Ve skupině F2-F4 bylo celkem 17 osob (23%), 9 mužů (52,9%) a 8 žen (47,1%).

Obě skupiny byly porovnány z hlediska stupně fibrózy také v závislosti na:

- na pohlaví
- věku
- toxikomanii

Laboratorní vyšetření k určení serologických markerů fibrózy :

Jejich přehled s výsledky u jednotlivých pacientů je uveden v tabulce č.10 a č.11.

Zde jsou uvedeny celé jejich názvy včetně rozmezí normálních hodnot.

Koagulační vyšetření

- INR-international normalised ratio 0,9-1,28
- APTT- aktivovaný parciální tromboplastinový čas 24-36 sec

Biochemická vyšetření

- celkový bilirubin séra 5-23 μ mol/l
- ALT-alaninaminotransferáza 0,13 -0,75 μ kat/l
- AST-aspartátaminotransferáza 0,22-0,94 μ kat/l
- GGT-gamaglutamyltransferáza 0-0,9 μ kat/l
- ALP -alkalická fosfatáza 0,67-2,15 μ kat/l
- cholesterol-2,9-5,0 mmol/l
- apolipoprotein A1 1,0-1,7 g/l – muži, 1,1-1,9 g/l -ženy
- albumin 35-50 g/l
- gama-globulin 6-11 g/l
- alfa2 makroglobulin 2,5-3,5 g/l muži, 1,75-4,2 g/l ženy
- haptoglobin 0,5-3,2 g/l
- glykemie 3,0-5,6 mmol/l
- alfa fetoprotein 0,1-10 IU/ml

Virologická vyšetření

- anti HCV, HBsAg, anti HIV 1+2
- HCV RNA kvantitativně

- genotyp HCV

Uvedené parametry byly vyšetřeny pro posouzení biochemické aktivity chronické hepatitidy C a pro výpočet sérových testů jaterní fibrózy. Všechny byly provedeny před jaterní biopsií.

Vyšetření sérových markerů fibrózy

K neinvazivnímu vyšetření jaterní fibrózy bylo užito těchto devíti sérových markerů jaterní fibrózy:

➤ De Ritisův index, výpočet:

AST/ALT

➤ APRI test, výpočet:

$$APRI = \frac{AST(/ULN)}{PLT(10^9/L)} \times 100$$

➤ Fib-4 test, výpočet:

$$Fib-4 = \text{věk (roky)} \times AST [U/L] / ((PLT [10^9/L]) \times (ALT [U/L])^{(1/2)}).$$

➤ Fornsův test, výpočet:

$$7,811 - 3,131 \cdot \ln(PLT) + 0,781 \cdot \ln(GGT) + 3,467 \cdot \ln(\text{věk}) - 0,014 \cdot (\text{cholesterol})$$

➤ FibroTest, výpočet:

$$z = 4,467 \times \log_{10} [\text{alfa2makroglobulin(g/L)}] - 1,357 \times \log_{10} [\text{haptoglobin(g/L)}] + 1,017 \times \log_{10} [GGT(IU/L)] + 0,0281 \times [\text{věk(roky)}] + 1,737 \times \log_{10} [\text{bilirubin}(\square \text{mol/L})] - 1,184 \times [\text{apolipoprotein A1(g/L)}] + 0,301 \times \text{pohlaví} (\text{žena}=0, \text{muž}=1) - 5,54$$

➤ Fibrofast, výpočet:

$$Fibrofast \text{ skóre} = [\text{Albumin(g/l)} \times 0,3 + PLT(10E9/l) \times 0,05] - [\text{ALP(IU/l)} \times 0,014 + \text{AST/ALT ratio} \times 6 + 14]$$

➤ Fibroindex, výpočet:

$$Fibroindex = 1,738 - 0,064(PLT \times 10E4/mm^3) + 0,005(AST[IU/l]) + 0,463(\text{gamaglobuliny})[g/dl].$$

➤ Cirrhosis discriminant score, výpočet:

CDS *Trombocyty* ($\times 10^9/L$): $>340 = 0$; $280-339 = 1$; $220-279 = 2$; $160-219 = 3$; $100-159 = 4$;
 $40-99 = 5$; $<40 = 6$

ALT/AST ratio: $>1.7 = 0$; $1.2-1.7 = 1$; $0.6-1.19 = 2$; $<0.6 = 3$

INR: $<1.1 = 0$; $1.1-1.4 = 1$; $>1.4 = 2$

CDS je součtem výše uvedených výsledků (možné hodnoty 0–11).

APindex

výpočet:

AP index *věk (roky)*: $<30 = 0$; $30-39 = 1$; $40-49 = 2$; $50-59 = 3$; $60-69 = 4$; $\geq 70 = 5$

Trombocyty ($\times 10^9/L$): $\geq 225 = 0$; $200-224 = 1$; $175-199 = 2$; $150-174 = 3$;

$125-149 = 4$; $<125 = 5$

AP je součtem výše uvedených výsledků (možné výsledky 0–10).

AP index 6 a vyšší je signifikantní pro pokročilou fibrózu.

Katalytické koncentrace enzymů ALT, AST, GGT a ALP, které byly užity pro výpočet sérových markerů fibrózy, tj. testů Fib-4, APRI, Forns, Fibrofast, Fibroindex, byly přepočítány do jednotek IU/litr, zatímco běžně v praxi užíváme výsledky v ukat/l (1 ukat = 60 U). Získané hodnoty jsou v tabulkách č. 10 a 11

Uvedené sérové testy jaterní fibrózy byly vypočítány u všech pacientů v souboru a porovnány statisticky.

Další statistické zpracování bylo zaměřeno na posouzení ev. rozdílů stupně fibrózy u kuřáků a nekuřáků, na posouzení výsledků sérových markerů u obou skupin.

Tabulka č. 10

	věk	ALT	AST	bili	chol	apoA1	PLT	GMT	HPT	A2M	gamaql	alb	INR	ALP	pohl.
1	38	1,78	0,9	11,9	3,94	1,23	253	1,19	0,67	2,46	10,3	47,2	1,19	1,94	1
2	27	4,86	2,1	13,8	6,43	1,593	223	2,28	0,69	2,87	12,2	46,6	1,14	2,72	1
3	35	4,18	2,18	20	5,33	1,34	149	3,77	0,88	2,58	10,7	52	1,16	1,21	1
4	19	2,36	1,55	22	2,83	1,03	232	1,4	0,61	2,46	13,4	46,1	1,14	0,79	0
5	61	0,77	0,77	11	4,57	1,3	199	1,39	0,86	2,51	14,3	42,9	1,28	1,05	1
6	26	2,57	1,32	30	3,6	1,11	220	0,63	1,28	2,78	9,9	42,5	1,11	1,75	1
7	33	1,1	0,75	24	6,37	1,16	129	0,23	1,09	2,9	13,4	45	1,07	1,45	0
8	34	0,59	0,51	12	4,05	1,64	251	0,29	0,36	2,81	14,2	45,4	1,09	2,11	0
9	42	1,6	0,82	13	3,11	1,39	209	0,51	0,99	2,01	10	43	1,09	1,39	1
10	40	1,1	0,55	36,1	4,01	1,71	221	0,25	1,03	1,99	20,6	44,3	1,02	1,17	0
11	24	1,3	0,72	8	3,36	1,25	148	0,2	1,01	2,91	13,4	44	1,22	1,46	1
12	25	0,67	0,56	19	2,68	1,21	159	0,94	0,35	3,13	14,9	44	1,09	2,27	0
13	53	0,7	0,46	9,4	4,71	1,59	218	0,25	1,09	2,04	13,7	48,6	1,14	1,5	0
14	22	0,93	0,42	8,9	4,53	1,67	234	0,5	0,9	2,05	14	44	1,09	2,18	0
15	51	0,18	0,28	7	4,22	1,62	290	0,52	1,14	2,18	12,9	45,1	1,02	0,79	0
16	49	3,03	1,8	10,7	4,24	1,59	173	1,77	1,63	2,74	20,8	44,4	1	1,2	1
17	25	0,16	0,3	11	4,42	1,72	287	0,25	1,03	3,04	10,8	41	1,15	1,15	0
18	24	0,53	0,43	7	3,49	1,65	190	0,44	1,06	1,95	10,1	48	1,15	1,29	1
19	28	4	1,05	10	4,51	1,36	174	1,44	1	2,22	15,1	41	1,21	1,47	1
20	41	1,77	1,2	10	4,98	1,01	102	1,38	0,62	3,06	10,5	47,7	1,09	1,45	1
21	33	0,98	1,03	7	4,16	1,49	131	0,32	1,23	1,59	10,3	44	1,14	1,09	1
22	51	2,34	1,87	22	3,98	1,22	146	1,65	0,89	2,89	17,9	46,4	1,2	0,92	1
23	34	0,76	0,65	10	3,05	1,34	198	0,3	1,07	1,88	13,6	48	1,32	0,88	1
24	21	0,26	0,39	12,1	4,02	1,28	130	0,3	1,27	1,84	12,1	45,9	1,38	1,35	1
25	53	2,05	1,75	31,3	4,74	1	137	0,94	0,56	3,68	14,4	43,3	1,01	0,96	0
26	53	0,71	0,62	8	7,27	0,98	153	1,23	0,88	3,03	13,6	44	1,07	0,98	1
27	52	0,84	0,56	19,5	4,23	1,16	229	0,53	0,71	2,79	21,6	40,1	1,12	0,78	0
28	26	1,69	0,9	7	4,96	1,37	206	0,33	1,06	2,24	14,3		1,13	1,27	1
29	42	1,47	1,03	14,5	6,47	1,44	288	0,13	1	2	15,2	43	0,94	1,16	0
30	55	2,62	1,69	27	2,96	1,12	140	2,11	0,74	51	17,1	43	1,03	1,56	1
31	23	0,96	0,76	19,5	5,15	1,61	183	0,32	1,04	2,04	10,2	50,1	1,09	0,09	0
32	33	9,24	4,29	12,5	6,07	1,44	197	3,47	0,88	2,8	18,6	49,9	1,29	1,09	1
33	32	5,75	3,14	19	4,68	1,2	149	0,79	0,78	3,28	12,3	45	1,11	1,18	0
34	58	9	0,83	17	4,1	1,06	106	1,63	0,33	3,42	21,3	42	1,02	1,23	0
35	22	9,6	2,04	12	3,59	1,21	258	1,05	0,39	2,87	17,1	47,9	1,27	0,9	1
36	27	0,74	0,71	21	4,48	1,23	140	0,41	0,7	2,73	19,3	48	1,45	1,31	0
37	40	2,09	1,31	10	4,44	1,66	342	7,17	0,96	1,85	14,2	47	1,05	1,32	1
38	29	0,49	0,46	6	5,57	1,63	349	0,21	1,02	1,72	13,6	55,5	1,18	0,93	0
39	49	2,22	1,65	9	2,23	1,03	167	1,73	0,49	3,49	17,4	47,6	1,14	1,47	0
40	26	0,59	0,51	7	4,72	1,58	253	0,66	0,89	1,77	13,8	39,2	0,88	1,86	0
41	23	0,91	0,59	5	4,5	1,67	183	0,39	0,92	1,61	11,6	45,6	1,11	0,76	0
42	25	1,12	0,99	23		1,112	155	0,25	1,1	2,45	22,1	49,9	1,06	0,87	1
43	23	1,81	1,03	11,2	3,81	1,21	234	0,37	0,25	3,81	12,4	48	1,2	3,27	1
44	29	0,98	0,6	5	4,08	1,11	362	0,85	0,84	2,02	14,1	45,5	1,11	1,17	1

Tabulka č. 10 pokračování

	věk	ALT	AST	bili	chol	apoA1	PLT	GMT	HPT	A2M	gammaql	alb	INR	ALP	pohl.
45	51	3,45	1,58	12	5,19	1,56	133	0,68	0,88	2,07	13,4	43	1,27	1,56	1
46	30	2,31	1,06	8,2	3,7	1,12	220	1,22	0,91	2,19	15,6	45,2	1,1	2,31	1
47	21	1	0,49	26,5	4,31	0,88	257	1,03	0,71	2,99	19,6	48,9	1,02	1,56	1
48	25	7,36	2,45	11,8	3,59	1,45	203	0,55	0,88	1,72	10,2	47,8	1,28	1,05	1
49	22	1,09	0,61	13,4	4,2	0,97	222	1,35	0,97	1,59	10,9	46,7	1,05	0,17	1
50	34	1,25	0,75	6	3,87	1,4	216	2,86	0,51	1,79	13,4	44,6	1,13	0,93	1
51	29	1,26	0,66	14,1	4,9	1,72	221	0,94	0,56	1,87	16,1	46,5	1,16	2,22	1
52	24	1,13	1,03	10	3,6	1,69	202	0,63	1,11	1,93	18,1	40,8	1,2	0,99	0
53	35	0,3	0,51	9	4,86	1,68	238	0,32	1,17	1,87	12,6	42,5	0,99	1,52	0
54	38	5,56	2,35	5	3,46	1,1	173	2,29	1,97	1,63	11,1	48,6	1,02	1,36	1
55	32	0,61	0,53	24	4,66	1,49	256	0,1	1,2	1,75	16	52	1,14	1,46	0
56	33	0,31	0,33	15,6	5,53	1,29	175	0,19	1,33	1,88	12,1	42,9	1,19	1,42	0
57	27	2,64	1,25	6,1	4,39	1,69	218	0,39	1,31	2,09	14	42,9	1,2	1,37	1
58	24	3,79	1,5	35	2,3	1,69	245	0,53	1,09	1,91	17,6	43,8	1,48	0,86	1
59	24	1,46	0,87	14,9	3,45	1,77	298	0,73	1,4	1,85	16,5	44,6	1,38	1,7	1
60	28	1,19	0,83	10,6	6,74	1,72	220	0,77	1,34	1,67	16,9	43,2	0,84	0,99	0
61	27	1,28	0,82	8	4,9	1,67	197	0,93	0,99	1,79	14,7	46	1,04	1,69	1
62	23	0,19	0,32	24,2	4,13	1,34	135	0,22	0,56	3,34	19,4	48,2	1,26	0,66	1
63	20	4	1,58	5,7	3,79	1,57	146	0,28	0,84	2,32	13,6	37,4	0,99	1,41	0
64	28	0,42	0,53	11,9	4,18	1,64	228	0,36	0,68	2,09	12,8	41,1	0,97	1,08	0
65	21	0,42	0,49	7,8	3,65	1,53	173	0,32	0,79	1,87	16,1	42,6	0,98	2,22	1
66	25	5,18	1,85	25	4,23	1,63	145	2,52	0,69	3,01	14,8	50,1	1,03	1,12	1
67	62	0,86	0,7	28,3	4,38	1,726	236	0,26	0,79	3,24	12,8	42	1,25	2,07	0
68	22	3,61	1,43	15,8	4,56	1,054	200	0,38	0,41	1,68	10,1	45,9	1,31	2,66	1
69	54	1,31	0,9	12	4,87	1,574	189	1,2	1,4	2,8	11,1	47,7	1,2	1,26	1
70	29	2,23	0,99	15	4,81	1,79	159	2,55	1,05	2,22	17	46,3	1,04	1,69	1
71	43	2,18	0,92	12	4,16	1,56	210	0,6	1,07	1,86	14,1	47	0,98	0,81	0
72	26	4,14	2,28	18	2,16	1,00	207	0,93	0,9	3,36	12,7	52,1	1,17	1,12	1
73	41	1,35	0,76	5,2	3,83	1,57	117	0,29	0,89	1,98	16,1	43	1,15	1,16	0
74	42	3,63	2,02	18,8	6,16	1,68	310	0,81	0,98	1,87	16	39,2	1,01	0,92	0

Tabulka č. 11

	AST/ALT	FORNS	APRI	Fib4	Fibrotest	Fibrofast	fibroindex	AP index	CDS
1	0,505	6,37585	21,34	0,784	0,10824	8,1504	0,86569	1	2
2	0,432	6,05916	49,8	0,893	0,049998	6,2532	1,50566	1	3
3	0,521	8,62954	87,78	1,94	0,72639	4,9076	1,93381	5	6
4	0,656	4,73948	40,08	0,639	0,300406	6,8304	1,33862	0	4
5	1	8,88095	23,21	2,083	0,572853	1,938	1,35749	6	6
6	0,513	5,00581	36	0,753	0,185493	5,202	1,18437	1	3
7	0,681	6,67801	34,88	1,416	-0,41471	0,646	1,75782	5	5
8	0,864	4,9109	12,19	0,696	-0,78371	5,2136	0,94206	1	4
9	0,512	6,67091	23,54	1,009	-0,89836	5,1104	1,1094	3	3
10	0,5	5,75754	14,93	0,735	-1,22161	6,3572	1,44238	3	2
11	0,553	5,07671	29,18	0,793	-1,31206	2,0556	1,62722	4	6
12	0,835	6,21194	21,13	0,833	0,564402	0,2332	1,57827	3	5
13	0,657	6,7662	12,66	1,035	-1,71452	6,278	1,11511	4	5
14	0,451	4,03995	10,76	0,317	-2,29306	6,3628	1,0146	0	2
15	1,555	6,31813	5,79	0,899	-1,60282	4,0364	0,56327	3	3
16	0,594	8,75324	62,42	2,268	-0,22856	3,398	2,13384	4	4
17	1,875	3,30411	6,27	0,506	-1,72942	0,434	0,49124	0	2
18	0,811	4,90852	13,57	0,577	-2,34325	3,9504	1,11863	2	4
19	0,262	6,63008	36,2	0,654	-0,80885	4,1932	1,63853	3	4
20	0,677	9,58467	70,58	2,808	0,856339	0,13	1,93135	7	5
21	1,051	6,91869	47,17	2,03	-2,52517	-1,4716	1,68549	5	7
22	0,799	9,37204	76,84	3,3	1,238478	1,6532	2,19337	7	6
23	0,855	5,69401	19,69	0,991	-1,67176	4,4308	1,29548	3	6
24	1,5	5,32721	18	0,957	-1,96493	-3,864	1,58323	4	6
25	0,853	9,25454	76,64	3,662	2,013462	-0,0844	2,05292	7	6
26	0,873	9,08328	24,31	1,974	0,784402	0,7888	1,57448	6	6
27	0,666	7,1396	14,67	1,074	0,508875	4,8288	1,44048	3	4
28	0,532	4,68762	26,21	0,676	-1,81362	-7,9588	1,35169	1	4
29	0,7	4,55246	21,45	0,959	-1,7955	8,1256	0,90756	2	2
30	0,645	9,97155	72,42	3,177	7,410042	0,7196	2,14073	7	5
31	0,791	4,60654	24,91	0,745	-1,89403	5,3584	1,26706	2	4
32	0,464	7,47757	130,65	1,829	0,320207	7,1204	2,62538	3	4
33	0,546	7,48227	126,44	2,178	0,526692	2,6828	2,29589	5	5
34	0,092	10,8092	46,98	1,172	2,035096	2,3148	2,29479	8	4
35	0,212	4,32686	47,44	0,434	0,251311	11,242	1,49053	0	3
36	0,959	6,93348	30,42	1,233	0,044732	0,5456	1,94859	4	6
37	0,626	7,00557	22,98	0,82	-0,44748	12,3352	0,59966	2	1
38	0,938	3,05402	7,9	0,422	-3,14386	13,6908	0,27208	0	3
39	0,743	8,87405	59,28	2,516	1,170577	2,9372	1,96982	5	5
40	0,864	4,58886	12,09	0,528	-2,41095	3,6636	0,91074	0	4
41	0,648	4,77014	19,34	0,602	-3,29135	4,3036	1,28088	0	5
42	0,883	6,43525	38,32	1,168	0,035455	2,6912	2,06623	3	6
43	0,569	3,96898	26,41	0,582	0,57838	5,9392	1,12352	0	3
44	0,612	4,05231	9,94	0,376	-1,32087	13,0952	0,25403	0	2

Tabulka č. 11 pokračování

	AST/ALT	FORNS	APRI	Fib4	Fibrotest	Fibrofast	fibroindex	AP index	CDS
45	0,457	6,375849	71,27	2,526	0,10824	8,1504	0,86569	7	5
46	0,458	6,059156	28,9	0,736	0,049998	6,2532	1,50566	2	3
47	0,49	8,629545	11,43	0,31	0,72639	4,9076	1,93381	0	2
48	0,332	4,739484	72,4	0,861	0,300406	6,8304	1,33862	1	4
49	0,559	8,880952	16,48	0,448	0,572853	1,938	1,35749	1	2
50	0,6	5,623842	20,83	0,817	0,53501	5,79	1,35749	2	5
51	0,523	7,464972	17,91	0,597	0,03034	0,394	1,18437	1	3
52	0,911	4,729865	30,59	0,891	-0,8861	5,768	1,75782	1	6
53	1,7	6,230015	12,85	1,06	-1,1477	4,5056	0,94206	1	5
54	0,422	6,314359	81,5	1,695	-0,90671	6,1724	1,1094	4	3
55	0,868	5,250988	12,42	0,657	-1,2135	2,2992	1,44238	1	5
56	1,064	5,003296	11,31	0,865	-0,11912	0,9136	1,62722	3	6
57	0,473	7,800566	34,4	0,738	-1,12956	5,6312	1,57827	1	4
58	0,395	3,498601	55,1	0,876	-2,59921	6,934	1,11511	0	3
59	0,595	6,287497	17,51	0,449	-1,62015	2,8688	1,0146	0	3
60	0,697	7,796592	22,63	0,75	-0,76957	3,7424	0,56327	1	3
61	0,64	4,832742	24,97	0,769	-0,86494	0,392	2,13384	2	4
62	1,684	4,467007	14,22	0,968	-2,59294	4,068	0,49124	4	8
63	0,395	5,704108	64,93	0,838	-1,33251	4,3444	1,11863	4	4
64	1,261	9,617914	13,94	0,777	0,875137	0,1132	1,63853	0	4
65	1,166	8,060139	16,99	0,71	-1,87965	-1,774	1,93135	3	5
66	0,357	8,091032	76,55	1,085	0,514034	1,5104	1,68549	4	4
67	0,813	7,025416	17,79	1,536	-0,91881	4,3972	2,19337	4	4
68	0,396	5,327209	42,9	0,641	-1,96493	-3,4692	1,29548	1	4
69	0,687	8,362562	28,571	1,74	1,509024	-0,412	1,58323	5	5
70	0,443	8,873279	37,35	0,936	0,665639	0,8056	2,05292	3	4
71	0,422	7,79712	26,285	0,988	0,88072	4,6608	1,57448	4	3
72	0,55	5,057644	66,08	1,09	-1,60436	-7,5472	1,44048	1	4
73	0,562	5,280009	38,97	1,775	-1,38405	8,0332	1,35169	7	5
74	0,556	7,794972	39,09	1,112	6,179128	1,0556	0,90756	2	1

3.2.3. Statistické hodnocení

Při statistickém zpracování byly porovnány výsledky jednotlivých sérových testů jaterní fibrózy, který z nich je schopen detekovat pacienty s jaterní fibrózou, jaká je korelace se stupněm fibrózy, který popsal patolog, do jaké míry reflektují jednotlivá stadia jaterní fibrózy.

Ke statistické analýze dat byl použit software SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA).

V kategoriálních parametrech byly skupiny podle stádia fibrózy porovnány pomocí Fisherova přesného testu, pro porovnání kvantitativních parametrů byl použit, vzhledem k nenormální distribuci hodnot, resp. malému počtu dat ve skupinách, Mann-Whitney U-test. Pro porovnání všech skupin podle stádia fibrózy byl použit Kruskal-Wallis test s testem Mann-Whitney s Bonferoniho korekcí signifikance kvůli mnohonásobnému porovnávání.

Normalita dat byla ověřena pomocí testu Shapiro-Wilk.

Testy byly dělány na hladině signifikance 0,05.

K posouzení vlivu kouření bylo do souboru zahrnuto 73 pacientů, u kterých jsme spolehlivě věděli, zda kouří.

K analýze vztahu kouření k jaterní fibróze byl při statistickém zpracování užit rovněž Fisherův přesný test, Mann-Whitney U-test a Studentův t-test.

Faktory pohlaví a toxikomanie byly statisticky posuzovány pomocí Fisherova přesného testu, věk pomocí Mann-Whitneyho U testu.

Popisné statistiky pro jednotlivé stupně fibrózy jsou uvedeny v následujících tabulkách č. 12a-d.:

Tabulka č.12a

		Statistics ^a								
		AST/ALT	apri	Fib4	FORNS	Fibrotest	Fibrofast	Fibroindex	AP_index	CDS
N	Valid	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Mean (průměr)		,698	27,403	,864	5,402	-1,639	5,834	1,202	1,84	3,47
Std. Deviation		,297	18,218	,423	1,469	1,005	2,943	,392	1,86	1,12
Minimum		,396	5,790	,422	3,054	-3,291	,404	,272	0	1
Maximum		1,555	81,500	1,775	8,501	,186	13,691	1,963	7	5
Percentiles	25	,500	13,940	,602	4,607	-2,348	4,304	1,005	1,00	3,00
	50 (medián)	,595	22,630	,745	4,985	-1,812	5,358	1,267	1,00	3,00
	75	,811	38,970	,899	6,059	-,953	7,613	1,366	3,00	4,00

a. Fibróza F0

Výpočet pro fibrózu F0

Tabulka č.12b

Statistics^a

		AST/ALT	apri	Fib4	FORNS	Fibrotest	Fibrofast	Fibroindex	AP_index	CDS
N	Valid	38	38	38	38	38	38	38	38	38
Mean		,709	33,712	1,035	5,989	-1,128	3,960	1,377	2,58	4,11
Std. Deviation		,366	26,506	,535	1,487	,993	4,110	,482	1,84	1,45
Minimum		,262	6,270	,317	3,304	-2,542	-7,959	,254	0	1
Maximum		1,875	130,650	2,526	8,955	,726	13,095	2,625	7	7
Percentiles	25	,458	17,590	,707	4,730	-1,943	1,365	1,026	1,00	3,00
	50 (medián)	,597	24,255	,871	5,731	-1,232	4,411	1,355	3,00	4,00
	75	,864	39,805	1,066	7,028	-,439	6,299	1,666	4,00	5,00

a. Fibróza F1

Výpočet pro fibrózu F1

Tabulka č.12c

Statistics^a

		AST/ALT	apri	Fib4	FORNS	Fibrotest	Fibrofast	Fibroindex	AP_index	CDS
N	Valid	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mean		,761	44,855	1,392	6,642	1,130	3,399	1,774	3,27	4,91
Std. Deviation		,370	34,999	1,038	1,873	2,113	4,292	,390	2,53	1,64
Minimum		,212	11,430	,310	4,153	,036	-3,308	1,148	0	2
Maximum		1,684	126,440	3,300	9,972	7,410	11,242	2,296	7	8
Percentiles	25	,546	14,670	,639	4,740	,251	,546	1,441	,00	4,00
	50 (medián)	,666	38,320	1,074	6,435	,527	2,683	1,868	3,00	5,00
	75	,883	72,420	2,178	7,482	,930	6,830	2,141	5,00	6,00

a. Fibróza F2

Výpočet pro fibrózu F2

Tabulka č.12d

Statistics^a

		AST/ALT	apri	Fib4	FORNS	Fibrotest	Fibrofast	Fibroindex	AP_index	CDS
N	Valid	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mean		,631	57,312	2,204	8,869	1,188	2,328	1,918	5,67	5,00
Std. Deviation		,290	19,111	,995	1,737	,710	2,899	,259	2,50	,89
Minimum		,092	24,310	1,090	5,611	,267	,056	1,575	1	4
Maximum		,873	76,640	3,662	10,809	2,035	7,739	2,295	8	6
Percentiles	25	,436	41,313	1,152	8,058	,655	,111	1,658	4,00	4,00
	50 (medián)	,710	62,680	2,245	9,169	1,013	1,552	1,951	6,50	5,00
	75	,858	72,095	3,021	9,891	2,019	4,138	2,113	7,25	6,00

a. Fibróza F3-F4

Výpočet pro fibrózu F3+F4

3.3 .Výsledky

3.3.1. Průkaz citlivosti vybraných sérových markerů fibrózy

Tabulka č.13a

	F0-F1 (n=57)	F2-F4 (n=17)	P
Pohlaví	34 / 23	9 / 8	
M/Ž	(59,6% / 40,4%)	(52,9% / 47,1%)	0,780 ^a
Věk	29,0 (24,5-39,0)	32,0 (24,0-52,5)	0,520 ^b
AST/ALT	0,595 (0,469-0,859)	0,677 (0,548-0,863)	0,372 ^b
APRI	23,5 (15,7-38,2)	46,9 (22,7-71,5)	0,017^b
Fib4	0,82 (0,67-1,05)	1,17 (0,90-2,66)	0,005^b
FORNS	5,59 (4,70-6,88)	7,14 (5,91-9,31)	0,004^b
FibroTest	-1,54 (-2,11; -0,66)	0,62 (0,28-1,21)	< 0,0001^b
Fibrofast	5,11(2,05-6,36)	2,32 (0,39-5,83)	0,069 ^b
Fibroindex	1,31 (1,02-1,63)	1,93 (1,53-2,10)	0,0001^b
AP index	2,0 (1,0-4,0)	4,0 (2,0-7,0)	0,015^b
CDS	4,0 (3,0-5,0)	5,0 (4,0-6,0)	0,009^b
toxikomanie	35 (61,4%)	9 (52,9%)	0,581 ^a

Porovnání stádií fibrózy F0-F1 vs. F2-F4

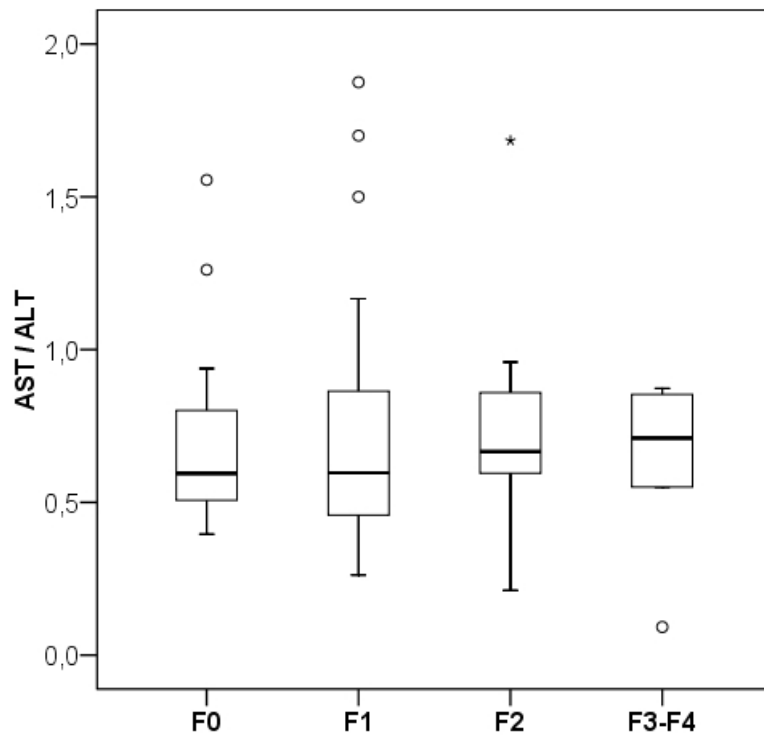
a ...Fisherův přesný test

b... Mann-Whitney U-test, medián (25.-75.percentil)

De Ritisův kvocient

Porovnáním hodnot deRitiseva kvocientu u obou skupin F0-F1 vs F2-F4 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, hladina signifikance je 0,372.

Graf č.1

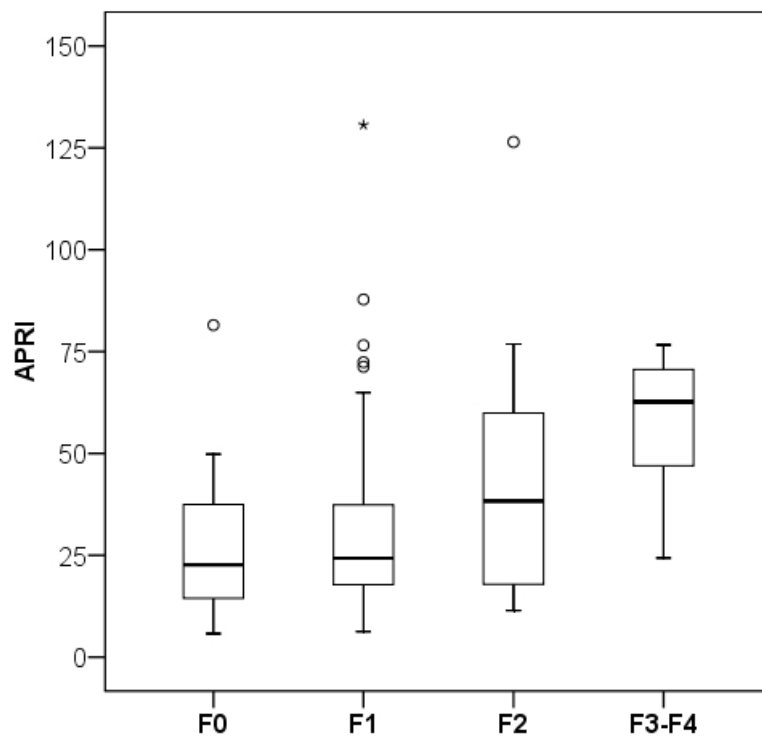


Vztah fibrózy a de Ritisova indexu

APRI

Vyšetřením poměru trombocytů a AST u obou porovnávaných skupin byly zjištěny signifikantně významné rozdíly, hodnota p je 0,017.

Graf č.2

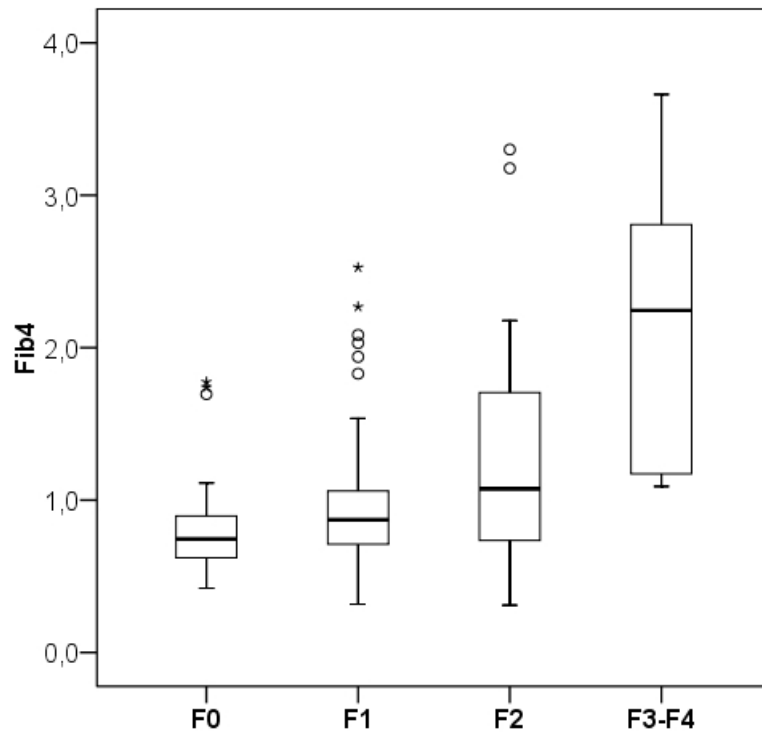


Vztah fibrózy a APRI

Fib-4

Hladina signifikance 0,005 vypovídá o statisticky významném rozdílu mezi výsledky Fib-4 u obou skupin.

Graf č.3

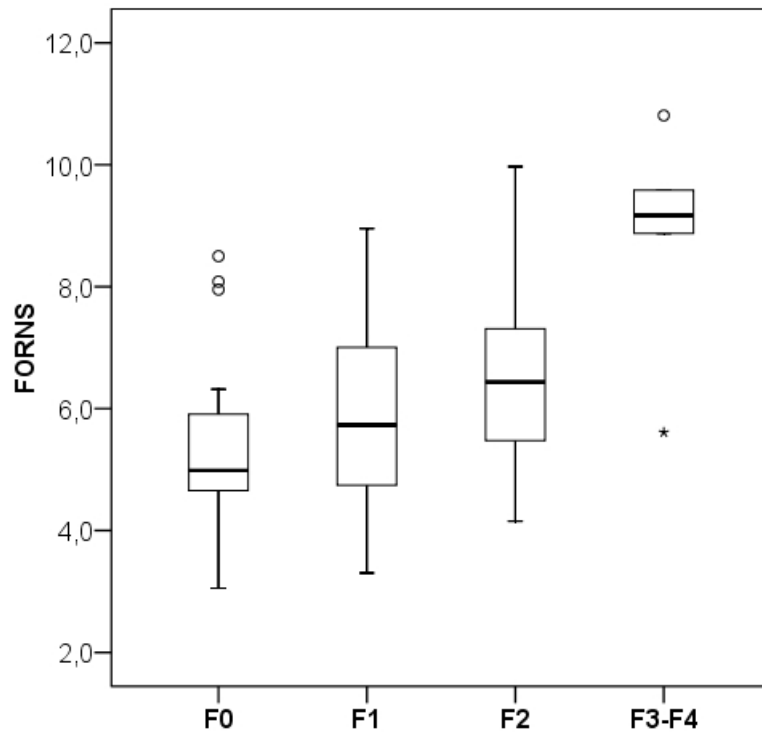


Vztah fibrózy a Fib4

FORNS

Fornsův index je z pohledu statistického porovnání obou skupin s hodnotou p 0,004 rovněž významný pro vyšetření významné fibrózy.

Graf č.4

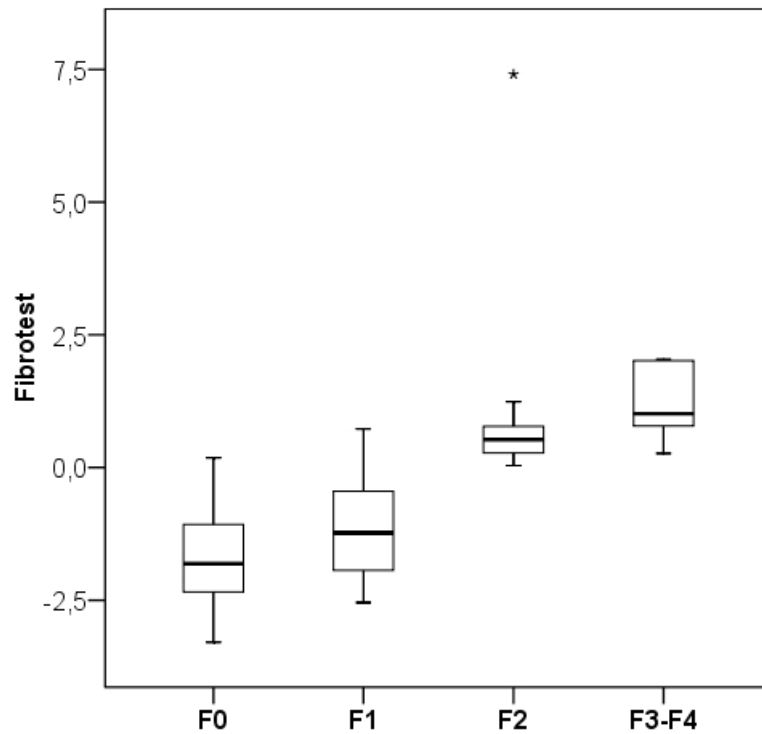


Vztah fibrózy a FORNS

FibroTest

U FibroTestu byla zjištěna velmi přesvědčivá hodnota signifikace $p < 0,0001$ a tedy představuje nejvýznamnější test pro diagnostiku pokročilé jaterní fibrózy.

Graf č.5

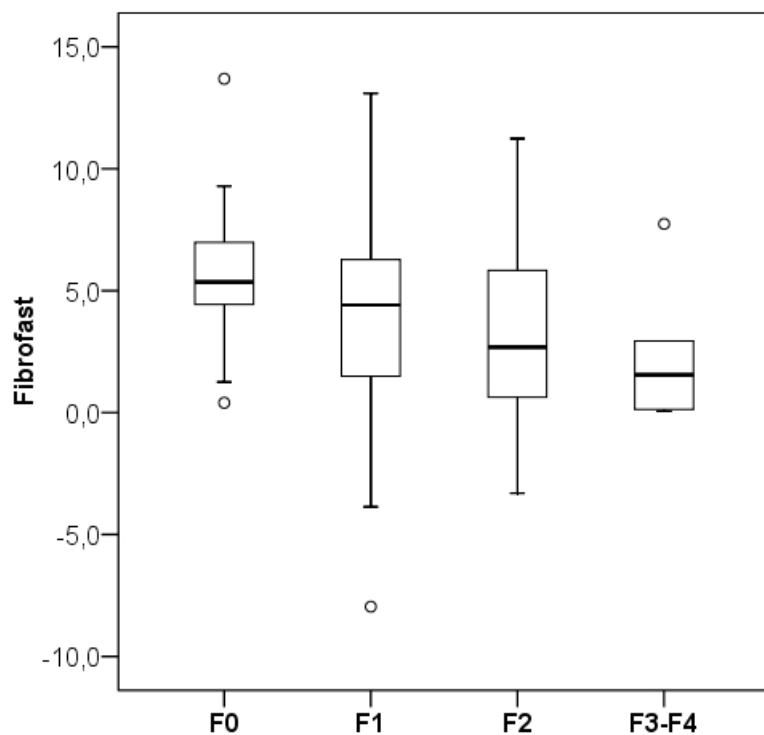


Vztah fibrózy a Fibrotestu

Fibrofast

Z porovnání hodnot Fibrofastu u pacientů obou skupin vyplývá, že s hodnotou $p = 0,069$ nejsou rozdíly statisticky významné.

Graf č.6

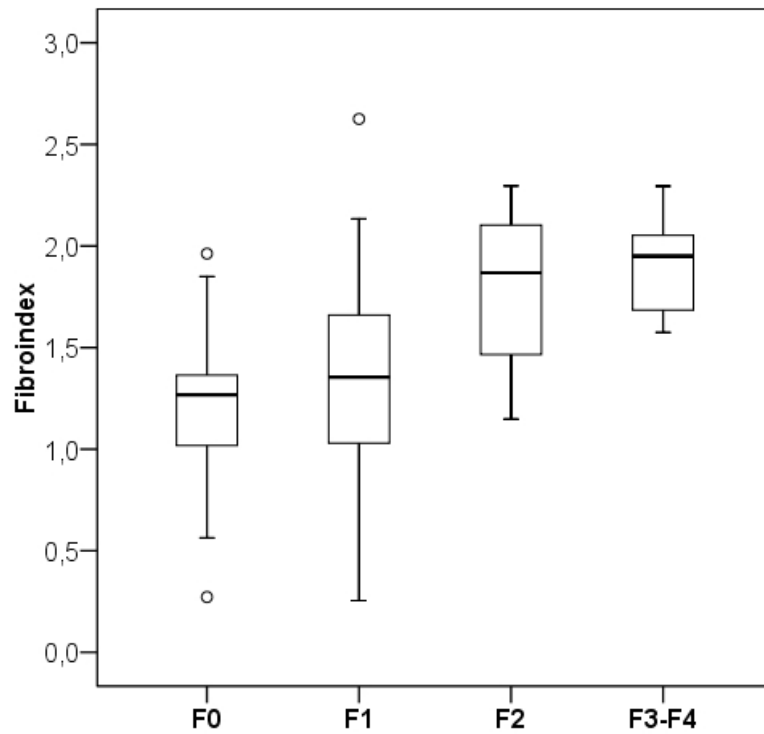


Vztah fibrózy a Fibrofastu

Fibroindex

Hodnoty Fibroindexu se statisticky významně liší u obou skupin, hladina signifikace p je 0,0001.

Graf č.7

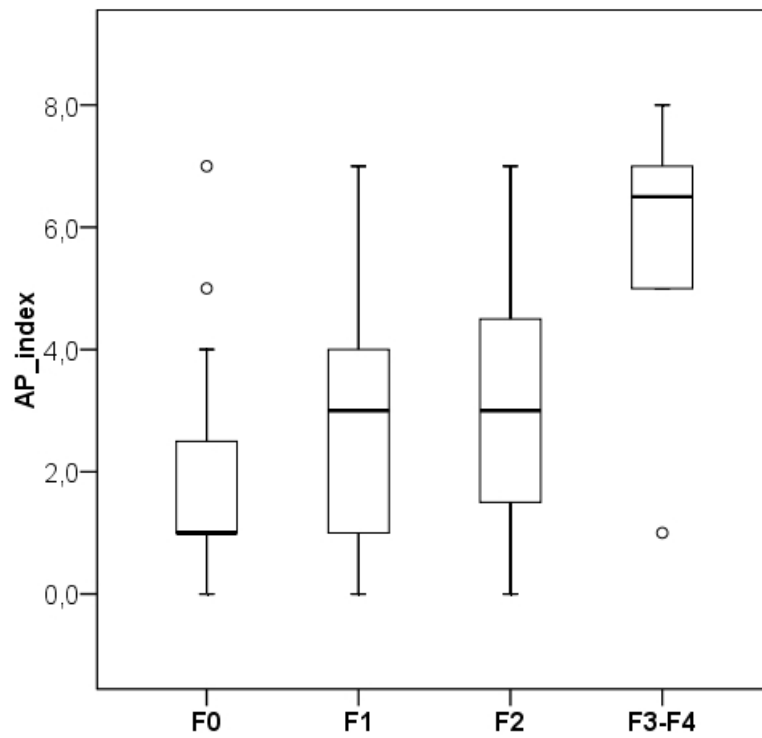


Vztah fibrózy a Fibroindexu

AP index

U AP indexu byla zjištěna hodnota signifikance $p = 0,015$, vypovídá tedy o zásadním rozdílu mezi výsledky AP indexu u obou sledovaných skupin.

Graf č.8

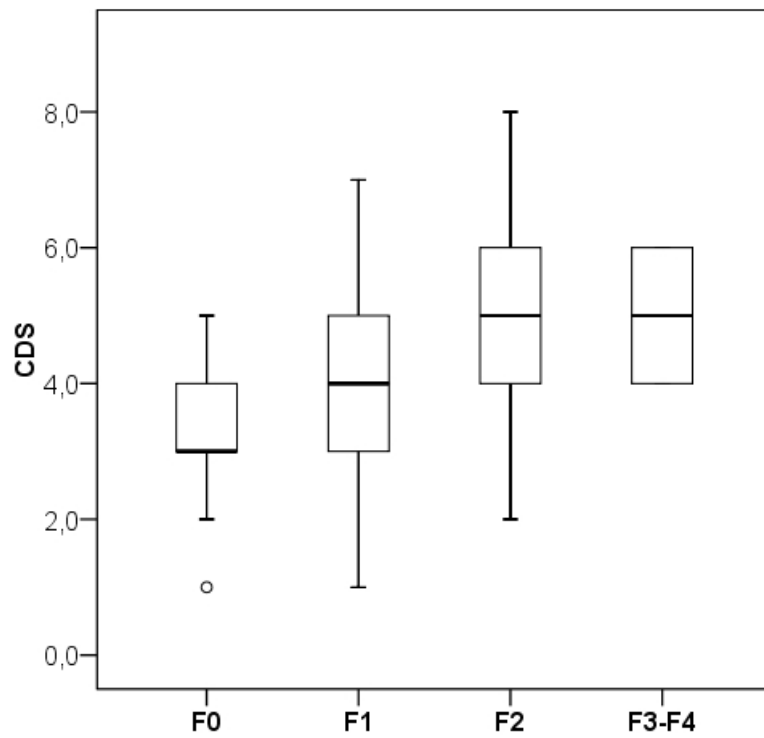


Vztah fibrózy a AP-indexu

CDS

Cirrhosis Discriminant Score vykazuje při statistickém porovnání významný rozdíl mezi skupinami F0-F1 a F2-F4. Hodnota p je 0,009.

Graf č.9



Vztah fibrózy a CDS

Tabulka č.13b

	F0 (n=19)	F1 (n=38)	F2 (n=11)	F3-F4 (n=6)	P
Pohlaví M	9 (47,4%)	25 (65,8%)	6 (54,4%)	3 (50,0%)	0,540 ^a
Věk	28,0 (24,0-40,0)	31,5 (25,0-38,5)	25,0 (22,0-51,0)	51,0 (37,3-54,3)	0,064 ^c
AST/ALT	0,595	0,597	0,666	0,710	0,812 ^c
APRI	22,6	24,3	38,3	62,7	0,052 ^c
Fib4	0,745	0,871	1,07	2,25	0,003^c
FORNS	4,99	5,73	6,44	9,17	0,004^c
Fibrotest	-1,81	-1,23	0,53	1,01	<0,0001^c
Fibrofast	5,36	4,41	2,68	1,55	0,089 ^c
Fibroindex	1,27	1,36	1,87	1,95	0,0005^c
AP index	1,0	3,0	3,0	6,5	0,012^c
CDS	3,0	4,0	5,0	5,0	0,023^c
toxikomanie	12 (63,2%)	23 (60,5%)	7 (63,6%)	2 (33,3%)	0,610 ^a

Porovnání stádií fibrózy F0, F1, F2, F3-F4

^a ... Fisherův přesný test

^c ... Kruskal-Wallisův test, medián (25.-75. percentil)

V tabulce jsou tučně vyznačeny hodnoty signifikance $< 0,05$, které odpovídají signifikantním rozdílům v hodnotách měřeného parametru v závislosti na stupni fibrózy. Tyto parametry byly dále analyzovány pomocí Mann-Whitney U-testu s Bonferroniho korekcí signifikance.

Tabulka č.14

	F0 vs. F1	F0 vs. F2	F0 vs. F3- F4	F1 vs. F2	F1 vs. F3- F4	F2 vs. F3- F4
Fib4	0,583	0,896	0,009	1,000	0,009	0,525
FORNS	0,873	0,488	0,009	1,000	0,011	0,423
Fibrotest	0,487	< 0,0001	0,002	0,0003	0,001	0,790
Fibroindex	1,000	0,007	0,006	0,087	0,046	1,000
AP-index	0,682	0,821	0,038	1,000	0,036	0,359
CDS	0,652	0,082	0,053	0,891	0,788	1,000

Signifikance Mann-Whitney U-testu s Bonferroniho korekcí na mnohonásobné porovnávání.

U parametru **Fib-4** byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty ve skupině F3-F4 ve srovnání s F0, resp. F1 (mediány 2,25 vs. 0,75, resp. vs. 0,87, $p = 0,009$ pro obě porovnání).

U parametru **FORNS** byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty ve skupině F3-F4 ve srovnání s F0, resp. F1 (mediány 9,17 vs. 4,99, resp. vs. 5,73, $p = 0,009$, resp. $p = 0,011$).

U parametru **AP index** byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty ve skupině F3-F4 ve srovnání s F0, resp. F1 (mediány 6,5 vs. 1,0, resp. vs. 3,0, $p = 0,038$, resp. $p = 0,036$).

U parametru **Fibrotest** byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty ve skupině F3-F4 ve srovnání s F0, resp. F1 (mediány 1,01 vs. -1,81, resp. vs. -1,23, $p = 0,002$, resp. $p = 0,001$). Signifikantně vyšší hodnoty byly zjištěny také ve skupině F2 ve srovnání se skup. F0, resp. F1 (mediány 0,53 vs. -1,81, resp. vs. -1,23, $p < 0,0001$, resp. $p = 0,0003$).

U parametru **Fibroindex** byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty ve skupině F3-F4 ve srovnání s F0, resp. F1 (mediány 1,95 vs. 1,27, resp. vs. 1,36, $p = 0,006$, resp. $p = 0,046$). Signifikantně vyšší hodnoty byly zjištěny také ve skupině F2 ve srovnání se skup. F0 (mediány 1,87 vs. 1,27, $p = 0,007$).

Z uvedených výsledků vyplývají závěry:

Pro identifikaci pokročilé fibrózy jsou přínosné a použitelné testy:

APRI, Fib4, Fornsův index, FibroTest, Fibroindex, AP index a CDS.

Testy FibroTest a Fibroindex jsou vhodné pro vyšetření odlišení fibrotických změn počínaje stupněm F2.

Rozdíl mezi skupinami F0 a F1 nereflektuje ani jeden z testů.

Testy Fib-4, Fornsův index, APRI, AP index jsou schopny odlišit až pokročilejší stadia F3, F4.

CDS je signifikantní pro fibrózu, schopen identifikovat pokročilou fibrózu a cirhózu, jak vyplývá i z jeho názvu. Není ale použitelný pro rozlišení jednotlivých stupňů fibrózy, protože hodnoty p mezi jednotlivými skupinami jsou $> 0,05$.

3.3.2. Hodnocení vztahu kouření a stupně jaterní fibrózy

Tabulka č.15

	kuřáci (n=41)	nekuřáci (n=32)	p
Stupeň fibrózy F0-F1/F2-F4	28 / 13 (68,3% / 31,7%)	28 / 4 (87,5% / 12,5%)	0,092 ^a
Stupeň fibrózy F0	6 (14,6%)	12 (37,5%)	0,019^a
F1	22 (53,7%)	16 (50,0%)	
F2	10 (24,4%)	1 (3,1%)	
F3-F4	3 (7,3%)	3 (9,4%)	
Věk (roky)	26,0 (23,0-33,0)	36,5 (27,3-49,0)	0,0003^b
Fib4	0,83 (0,64-1,13)	0,97 (0,74-1,46)	0,226 ^b
FORNS	5,66 (4,71-7,16)	5,91 (4,75-7,74)	0,705 ^b
Fibrotest	-0,79 (-1,85; 0,52)	-1,40 (-2,17-0,09)	0,221 ^b
Fibroindex	1,57 (1,27-1,78)	1,23 (0,94-1,93)	0,065 ^c
AP index	2,0 (1,0-4,0)	3,0 (1,0-4,0)	0,581 ^b
CDS	4,0 (3,0-5,0)	4,0 (3,0-5,0)	0,285 ^b

Porovnání skupiny kuřáků a skupiny nekuřáků

medián (25.-75.percentil)

^a ...Fisherův přesný test

^b ... Mann-Whitney U test, medián (25.-75.percentil)

^c ... Studentův t-test

Výsledky

Fisherův přesný test a analýza adjustovaných reziduí

Tabulka č.16a

kouření * fibrosa Crosstabulation

			fibrosa				Total
			F0	F1	F2	F3-F4	
kouření	ano	Count	6	22	10	3	41
		%	14,6%	53,7%	24,4%	7,3%	100,0%
		Adjusted Residual	-2,2	,3	2,5	-,3	
	ne	Count	12	16	1	3	32
		%	37,5%	50,0%	3,1%	9,4%	100,0%
		Adjusted Residual	2,2	-,3	-2,5	,3	
Total	Count	18	38	11	6	73	
	%	24,7%	52,1%	15,1%	8,2%	100,0%	

Tabulka č.16b

Fisher's Exact Test

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test	9,522	,019
N of Valid Cases	73	

Fisherův přesný test (stupeň fibrózy z kategorizován 2 kategorií F0-F1 a F2-F4)

Tabulka č.16c

kouření * fibrosa Crosstabulation

			fibrosa		Total
			F0-F1	F2-F4	
kouření	ano	Count	28	13	41
		% within kouření	68,3%	31,7%	100,0%
	ne	Count	28	4	32
		% within kouření	87,5%	12,5%	100,0%
Total	Count	56	17	73	
	% within kouření	76,7%	23,3%	100,0%	

Tabulka č.16d

Fisher's Exact Test

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test		,092
N of Valid Cases	73	

Porovnání ve věku

Tabulka č.17a

		Tests of Normality		
		Shapiro-Wilk		
	kouření	Statistic	df	Sig.
věk	ano	,811	41	,00001
	ne	,941	32	,080

a. Lilliefors Significance Correction

Test normality věku

Tabulka č. 17b

	věk
Mann-Whitney U	328,000
Z	-3,650
Asymp. Sig. (2-tailed)	,0003

a. Grouping Variable: kouření

Výsledek Mann-Whitney U testu

Porovnání kuřáků a nekuřáků v parametrech Fib4, FORNS, FibroTest, Fibroindex, AP index a CDS

Tabulka č.17c

	Fib4	FORNS	Fibrotest	AP index	CDS
Mann-Whitney U	547,000	622,000	546,000	607,000	562,000
Z	-1,212	-,378	-1,223	-,551	-1,069
Asymp. Sig. (2-tailed)	,226	,705	,221	,581	,285

a. Grouping Variable: kouření

Porovnání souborů-výsledky testu Mann-Whitney

Tabulka

č.17d

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
fibroindex	1,878	,175	1,873	71	,065	,2111937	,1127616

Výsledek Studentova t-testu

Z uvedených výsledků vyplývají závěry:

Ve skupině kuřáků byl zjištěn signifikantně vyšší podíl pacientů se stupněm fibrózy F2 a signifikantně nižší podíl pacientů se stupněm fibrózy F0 ($p = 0,019$, Fisherův přesný test a analýza adjustovaných reziduí).

Podíl pacientů se stupněm fibrózy F2-F4 ve skupině kuřáků a nekuřáků se nelišil statisticky významně ($p = 0,092$, Fisherův přesný test).

Kuřáci byli signifikantně mladší než nekuřáci ($p = 0,0003$, Mann-Whitney U-test). Medián věku kuřáků byl 26,0 let, medián věku nekuřáků byl 36,5 let.

Ve výsledcích sérových testů fibrózy se kuřáci a nekuřáci nelišili statisticky významně.

U Fibroindexu byla zjištěna hodnota $p=0,065$, ale ani ta nedosahuje hladiny signifikace 0,05.

3.3.3. Zjištěná fibróza v souboru nemocných s chronickou hepatitidou C

U všech pacientů zařazených do studie byla provedena jaterní biopsie a v histologickém nálezu byly popsány stupně fibrózy:

F0 u 19 pacientů tj. 25,6%

F1 u 38 pacientů tj. 51,3%

F2 u 11 pacientů tj. 14,8%

F3 u 3 pacientů tj. 4,05%

F4 u 3 pacientů tj. 4,05%

Jde o naivní pacienty z hlediska léčby interferonem a ribavirinem.

3.3.4. Vztah stupně fibrózy k dosažené SVR

U stupně F0 se SVR vyskytla v 68% (13 z 19), u stupně F1 v 66% (25 z 38), u stupně F2 v 82% (9 z 11) a stupně F3-F4 v 17% (1 z 6).

Lze říci, že SVR je častější u nižšího stupně fibrózy (tj. F0, F1 a F2) než u F3-F4, ale tento rozdíl není statisticky významný. Hladina signifikance Fisherova přesného testu, který byl pro porovnání výskytu SVR použit, byla $p = 0,067 (>0,05)$.

Tabulka č.18a,b

Crosstabulation

			SVR		Total
			ano	ne	
fibrosa	F0	Count	13	6	19
		%	68,4%	31,6%	100,0%
	F1	Count	25	13	38
		%	65,8%	34,2%	100,0%
	F2	Count	9	2	11
		%	81,8%	18,2%	100,0%
	F3-F4	Count	1	5	6
		%	16,7%	83,3%	100,0%
Total		Count	48	26	74
		%	64,9%	35,1%	100,0%

Fisher's Exact Test

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test	6,890	,067
N of Valid Cases	74	

Kontingenční tabulka a výsledky Fisherova přesného testu

3.3.5. Vztah mezi stupněm fibrózy, věkem a toxikomanií

Pohlaví:

Stádia fibrózy F0-F1 a F2-F4 se nelišily statisticky významně podle pohlaví ($p=0,780$, Fisherův přesný test).

Věk:

Medián věku pacientů ve skupině F0-F1 byl 29,0 let. Ve skupině F2-F4 32,9 let, rozdíl ve věku nebyl signifikantní ($p=0,520$, Mann-Whitney U test).

Toxikomanie:

Ve skupině F0-F1 bylo 61,4 % drogově závislých, ve skupině F2-F4 to bylo 52,9 %, rozdíl není signifikantní ($p=0,581$, Fisherův přesný test).

Stupeň jaterní fibrózy není ovlivněn dřívější konzumací drog, není závislý ani na pohlaví ani na věku.

4. Diskuze

Jaterní fibrogenese a fibrolýza jsou dynamické procesy a dnes již je všeobecně akceptován názor, že fibróza je nejen důsledkem převahy fibrogenese v jinak vyrovnaném stavu obou procesů, ale i stavem reverzibilním. To prezentoval Friedman v roce 2003. Shrnul výsledky studií, které se věnovaly léčbě chronické hepatitidy B a C, dále autoimunitní hepatitidy a biliárnímu poškození jater. Studie prokázaly, že díky kauzální léčbě chronických jaterních onemocnění, tj. antivirotiky, imunosupresivy, biliární drenáže a podobně, může dojít k regresi fibrozních změn (Friedman 2003). Při léčbě jsou monitorovány virologická odpověď, aktivita transamináz nebo parametry cholestázy. Dnes se však ukazuje, že stejně důležitý je i staging chronického jaterního onemocnění, tedy monitorování jaterní fibrózy zejména v souvislosti s léčbou. Cestou by bylo opakování jaterní biopsie, ta má však svá rizika, možné komplikace a většina pacientů si opětovnou biopsii nepřeje. Jako alternativu jaterní biopsie lze využít neinvazivní metodu, tedy sérové markery jaterní fibrózy.

De Ritisův kvocient AST/ALT představuje jednoduchý test pro predikci jaterní cirhózy. Park testoval jeho diagnostický přínos na souboru 153 pacientů s chronickou hepatitidou C, kteří současně podstoupily jaterní biopsii. Podle původních prací hodnota de Ritisova indexu reflektovala stupeň jaterní fibrózy a stupeň nekroticko-zánětlivé aktivity. Požadovaným cílem Parkovy studie bylo identifikovat v souboru nemocné s jaterní cirhózou, u kterých by potom nebyla nezbytná jaterní biopsie (Park 2000). Test se ukázal specifický pro průkaz cirhózy a reflektoval i stupeň fibrózy. V naší práci se však rozdíl v hodnotě de Ritisova indexu ukázaly statisticky nevýznamné a test neodlišil cirhózu ani rozvinutou fibrózu F2-F4.

Další sérový marker jaterní fibrózy *Fibrofast* byl vytvořen pro odlišení pokročilé fibrózy a cirhózy. Byl publikován na kohortě pacientů s chronickou hepatitidou C, kteří byli v přibližně stejném věku jako nemocní našeho souboru. Přestože jde podle literárních referencí o „lákavý“ a jednoduchý test, který má pozitivní prediktivní hodnotu 99%, a je dokonce zahrnut do doporučení APASLu (2009) k diagnostice jaterní fibrózy, v našem souboru nebyly rozdíl u pacientů s různými stadii fibrózy statisticky významné. Fibrofast, stejně tak jako de Ritisův kvocient, nepřinesly v našem souboru výsledky, které by odlišily skupinu pacientů s cirhózou a bez cirhózy, jak publikovali Attalah a Shiha v roce 2006 (Attalah, Shiha 2006).

Fornsův index byl poprvé publikován v roce 2002 rovněž na souboru pacientů s chronickou hepatitidou C. Z rozboru výsledků od 476 pacientů vzešly 2 cutoff hodnoty: 4,2

a 6,9, které vymezovaly přítomnost či nepřítomnost signifikantní fibrózy a jaterní cirhózu (Forns 2002). V naší práci vykazaly hodnoty Fornsova indexu statisticky významné rozdíly mezi skupinami F0-F1 a F2-F4. Pro odlišení jednotlivých stupňů mírnější fibrózy se však Fornsův test nehodí. Hodnoty Fornsova testu jsou v našem souboru vyšší než publikovaná cutoff hodnota 4,2. Podle Thabuta se to vysvětluje použitím trombocytů jako jednoho z parametrů, protože stanovení trombocytů nemá jednotný standard ve všech laboratořích (Thabut 2003).

Fib-4 byl jako test k predikci fibrózy poprvé představen Sterlingem v roce 2006 na souboru pacientů s chronickou hepatitidou C a koinfekcí HIV (Sterling 2006). Výsledky tohoto testu fibrózy byly porovnány s histologickými nálezy hodnocenými dle Ishaka. Autoři identifikovali hodnoty $>3,25$ jako ty, které predikují významnou fibrózu a hodnoty $< 1,45$ jako spolehlivě vylučující pokročilé fibrotické změny. Stejně tak vyznívá i práce Valleta-Picharda z roku 2007, který srovnává výsledky Fib-4 s histologií a FibroTestem. Ve vlastním souboru jsou výsledky tohoto testu u pacientů s fibrózou F0-F2 ve shodě s výsledky uváděnými v literatuře, u stadií F3-F4 jsou však hodnoty nižší. Vysvětlením nejspíše bude menší počet pacientů ve skupinách F3-F4. Navzdory hodnotám referovaným v literatuře můžeme konstatovat, že Fib-4 vykazuje signifikantní rozdíly mezi skupinami F0-F1 a F2-F4.

APRI je indexem často užívaným v mnoha pracích k neinvazivní diagnostice jaterní fibrózy. Wai a kolektiv tento jednoduchý matematický model uplatnil na souboru pacientů s chronickou hepatitidou C (Wai 2003). Cutoff hodnoty pro vyloučení signifikantní fibrózy, predikci fibrózy či jaterní cirhózy jsou různé. V našem souboru APRI index nevyšel jako přínosný k odlišení pacientů s rozvinutou fibrózou, výsledky nevykazují statisticky významné rozdíly, a také se značně rozcházejí s hodnotami uvedenými v literatuře.

FibroTest asi dosáhl největšího úspěchu, a to i z komerčního hlediska. Asi nejvíce je spolu s FibroScanem doporučován jako možná neinvazivní alternativa jaterní biopsie. Jeho původní verze, prezentovaná Rossim v roce 2003 (Rossi 2003), byla směřována k pacientům s chronickou hepatitidou C. V dalším průběhu byly odvozeny verze i pro jiná jaterní onemocnění než chronickou virovou hepatitidu. Výsledky mají být srovnatelné s reprezentativní jaterní biopsií, kdy je získán vzorek o délce 25 mm. Skladba jednotlivých veličin by měla postihnout aktivitu hepatocytů a hvězdicových buněk, extracelulární matrix, časnou cholestázu, která může být projevem těžší fibrózy. Ze znalosti parametrů zahrnutých do FibroTestu – A2M, haptoglobin, apolipoprotein A1, bilirubin, GGT, vyplývá, že nelze použít FibroTest u nemocných s hemolýzou, extrahepatickou cholestázou a hyperbilirubinemií při Gilbertově sy. V našem souboru vyšel FibroTest jako absolutně

nejlepší. Hodnota signifikace $p < 0,001$ je velmi přesvědčivá a staví FibroTest nejvýše v hierarchii posuzovaných sérových testů. Při mnohonásobném porovnávání FibroTest v souladu s písemnictvím vykazuje statisticky významné rozdíly i mezi stadii F0 a F2 a mezi F1a F2.

Fibroindex je rovněž komponován jako jednoduchý index, v praxi zcela dostupný, protože parametry ,tj. trombocyty, AST a gamaglobuliny u pacientů s nemocemi jater běžně vyšetřujeme. V původní práci Kody byl tento test vyšetřen u 30 nemocných před léčbou HCV infekce interferonem a po léčbě. Rebioptovaný histologický vzorek, porovnaný se vstupním histologickým vyšetřením, prokázal zlepšení stagingu fibrózy a to i v souladu s Fibroindexem. V našem souboru představuje Fibroindex druhý nejpřínosnější sérový test k identifikaci rozvinuté fibrózy. Hůře však než FibroTest odliší diskretní rozmezí mezi F1a F2.

AP index je spolu s **Cirrhosis Discriminant Score (CDS)** založen na bodovém hodnocení jednotlivých kritérií, pro která jsou dána určitá rozmezí . Vlastním pozorováním zjištěná hodnota 6,5 pro F3-F4 odpovídá i hodnocení, které je uvedeno v původní práci Lacknera. AP index má v sobě schopnost odlišit pacienty bez fibrózy nebo s incipientní fibrózou od těch, kde již fibróza dospěla do stadia F3-F4. Cirrhosis Discriminant Score (trombocyty, ALT/AST, INR) má dle Bonacciniho odlišit pacienty s jaterní cirhózou. Ve vlastním souboru je hodnota CDS 5 a představuje signifikantně významný výsledek pro F3-F4.

Jedním z cílů disertační práce je i porovnání našich výsledků sérových testů s výsledky zahraničních autorů. V naší studii však byly porovnány jediné sérové markery, bez kombinace s některou zobrazovací metodou ,tj. zejména elastografií nebo dechovým testem. Přesného rozlišení jednotlivých stupňů fibrózy ve vlastní studii jsou schopny jediné FibroTest a Fibroindex. Ty také jsou v písemnictví uváděny jako testy schopné alternovat jaterní biopsii (Koda 2007, Rossi,2003). V naší práci jsme také studovali jen ty sérové markery jaterní fibrózy, které využívají běžně vyšetřované laboratorní testy. Jako parametr nebyla zavzata kyselina hyaluronová ani některý z ukazatelů obratu kolagenu. Rovněž tak nebyla zkoumána „výtežnost“ kombinací sérových markerů jaterní fibrózy. Právě kombinace různých testů by měla zlepšit diagnostiku fibrózy (Burroughs 2007).

V závěru tohoto cíle disertační práce je nutné konstatovat, že většina ve světě provedených studií zaměřených na využití sérových markerů jaterní fibrózy k jejímu průkazu zejména u chronické hepatitidy C ukazuje, že testy jsou schopny odlišit stupně fibrózy F3, F4 od F0, tedy nepřítomnost fibrózy od jejího vysokého stupně, případně cirhózy. Střední stádia fibrózy,

tedy ta, která jsou důležitá pro monitorování například léčebného účinku zatím většina sérových markerů nepostihuje. To je asi i důvodem, proč se tyto testy u nás v praxi neprovádějí. Na druhou stranu ani jaterní biopsie, která je doposud zlatým standardem, nemusí zcela striktně odlišit stadia F2 a F3. Příčinou nejsou jen možné interindividuální rozdíly v hodnocení, ale i fakt, že fibrotické změny nemusí být distribuovány stejně v celých játrech. Domníváme, že i u nás by měly některé sérové markery jaterní fibrózy být zavedeny do arzenálu pomocného hepatologického vyšetření. Výsledky naší studie ukazují, že by to měl být FibroTest a Fibroindex, zejména u nemocných s chronickou hepatitidou C. Jsou levné, dostupné a využívají běžně vyšetřované parametry. Ceny uvedených testů jsou od nejlevnějšího AP indexu za 28 Kč po dražší Fibroindex za 116Kč a Fibrotest asi za 640Kč. Testy tedy zásadně nezatíží rozpočet pracoviště a zdravotních pojištoven. Výsledky naší práce by tedy měly podpořit zavedení těchto sérových testů do praxe k monitorování jaterní fibrózy, a to již také proto, že jaterní fibróza bude zřejmě horkým tématem hepatologie příštích let.

Cílem další naší výzkumné práce bude použití těchto testů u NAFLD. Tato problematika však bude složitější. Kromě metabolických změn je nutné respektovat obecné vlastnosti sérových markerů fibrózy. Ty by měly být specifické pro játra, neovlivněné poruchou funkce ledvin a retikulo-endoteliálního systému, schopné měřit aktivitu ukládání a degradace ECM a být levné.

Ve sledovaném souboru byli výrazněji zastoupeni pacienti s nižšími stupni fibrózy. U těchto nemocných F0-F2 byly také dosaženy mnohem lepší terapeutické výsledky ve smyslu dosažení SVR. Toto zjištění není nové, podobné výsledky byly publikovány již dříve v době monoterapie konvenčním interferonem. To stejné platí i pro předpoklad výsledku léčby pegylovaným interferonem a ribavirinem. Podle Urbánka absence přemostující fibrózy nebo cirhózy jsou nezávislými prediktory dosažení SVR (Urbánek, 2004).

Názory na kouření jako faktor zevního prostředí, který by mohl ovlivnit průběh chronické hepatitidy C jsou různé, od pouze hypotetického vlivu (Urbánek, Husa, 2010) až po vysloveně negativní vliv na progresi onemocnění (Pessione 2001, Zein 2010, Hézode 2003). V české populaci je počet kuřáků odhadován na 3,3 milionů lidí (www.kurakovaplice.cz), můžeme tedy předpokládat nezanedbatelné důsledky kouření i u české populace pacientů s nemocnými játry. Ve sledovaném souboru představují kuřáci 56,16%. Ve shodě s dříve popsáním negativním vlivem kouření cigaret bylo procentuální zastoupení nemocných s rozvinutou fibrózou F2-F4 zjištěno ve skupině kuřáků, i když p 0,05 nedosahuje požadované hodnoty signifikance. Signifikantně vyšší zastoupení kuřáků s fibrózou F2 je

potvrzeno hodnotou $p = 0,019$. Vzhledem k těmto výsledkům jsme se pokusili zjistit, zda je vliv kouření patrný i ve výsledcích sérových testů jaterní fibrózy. Statistickým zpracováním ale nebyl tento předpoklad jednoznačně potvrzen. Jako jediný test, který by mohl snad být vhodnější k identifikaci pokročilé fibrózy u kuřáků (ve srovnání s nekuřáky) je FibroIndex, kde hodnota $p=0,065$. Hodnocení u stadií F3, F4 je obtížnější, vzhledem k malému počtu nemocných ve skupinách F3 a F4.

Jaterní biopsie zůstává stále „zlatým standardem“ pro diagnostiku jaterních fibrózy. Vyšetření sérových markerů jaterní fibrózy však poskytuje vhodnou a dostupnou alternativu pro případy, kdy nemáme pochyby o etiologii jaterního onemocnění, kdy všechna další vyšetření vylučují přítomnost jiného onemocnění než hepatitidy C. Tento neinvazivní postup by byl diagnostickou možností pro nemocné, kteří odmítají jaterní biopsii, nebo v případech, kdy by byla jaterní biopsie riziková. Stejně tak by tyto testy byly přínosné k „monitorování“ jaterní fibrózy, k verifikaci ústupu fibrotických změn po terapii pegylovaným interferonem a ribavirinem, v opačném případě u nonresponderů ke sledování možné progresse do jaterní cirhózy.

V práci jsme rovněž sledovali závislost stupně fibrózy na pohlaví, věku a předchozí i.v. toxikomanii. Ani jeden z těchto parametrů se při statistickém porovnání se zjištěným stagingem fibrózy neukázal jako podstatný pro progresi jaterní fibrózy.

5. Závěry

V návaznosti na stanovené cíle disertační práce jsme došli k těmto závěrům:

Primární cíle:

První cíl: V prospektivní studii na souboru 74 naivních nemocných s chronickou hepatitidou C jsme zjišťovali specifickost a senzitivitu některých sérových markerů jaterní fibrózy v korelaci se stupněm jaterní fibrózy prokázaným histologickým vyšetřením vzorků jaterní tkáně získaných necílenou perkutánní jaterní biopsií. Podobná studie u nás ještě provedena nebyla.

Vyšetřovali jsme následujících 9 testů: AST/ALT, APRI, Fib-4, Fornsův test, FibroTest, Fibrofast, Fibroindex, AP index a CDS. Jde o tak zvané rutinní sérové markery jaterní fibrózy a vybrali jsme je z množství jiných ve světě užívaných zejména proto, že jednotlivé jejich parametry jsou rutinně používané a testy jsou laciné. Prokázali jsme:

- Testy APRI, Fib-4, Fornsův test, FibroTest, Fibroindex, AP index, CDS jsou dostatečně specifické a senzitivní k průkazu jaterní fibrózy ve stadiu F3–F4 u naivních nemocných s chronickou hepatitidou C. Tento poznatek je ve shodě s výsledky jiných publikovaných studií.
- FibroTest a Fibroindex jsou schopny odlišit fibrotické změny počínaje stadiem F2. Tento poznatek je velmi důležitý například pro monitorování nemocných s chronickou hepatitidou C. Oba testy podle našich výsledků rozliší střední stupeň jaterní fibrózy F2 od těžkého stupně F3–4. Výsledky dosud publikovaných studií jsou jak ve shodě s našimi poznatky, tak ale i v diskrepanci. Obecně je to ale hlavně malá citlivost a specifickost sérových markerů jaterní fibrózy pro detekci středních stadií fibrózy, která je zatím diskvalifikuje pro rutinní zavedení do široké hepatologické praxe. Nám se však FibroTest a Fibroindex ukázaly jako vhodné pro monitorování středních a těžkých stupňů jaterní fibrózy u naivních nemocných s chronickou hepatitidou C a doporučujeme jejich zavedení alespoň v této indikaci do praxe. Z tohoto pohledu jde o poznatek u nás původní.
- CDS je signifikantní pro jaterní fibrózu.

- Časná stadia fibrózy, a tedy rozdíl mezi F0 (fibróza není přítomná) od stadia F1 (lehký stupeň fibrózy) nereflektuje žádný z námi studovaných testů. Zde je ale třeba připomenout, že i „zlatý standard“ pro diagnostiku jaterní fibrózy, tj. jaterní biopsie, nemusí zcela přesně reflektovat jednotlivá její stadia. Je to dáno zejména dvěma okolnostmi. Ačkoliv jaterní fibróza je procesem difúzním, nemusí být změny v jednotlivých částech jater stejné a za druhé, histologické vyšetření je zatížené inter-individuální chybou.
- Pokud srovnáváme naše výsledky s poznatky zahraničních autorů, podporují stanovisko pro zavedení sérových markerů jaterní fibrózy do rutinní praxe neinvazivního monitorování chronické hepatitidy C. Sami upřednostňujeme na základě výsledku této studie markery FibroTest a Fibroindex. U nás podobná studie nebyla provedena a nelze proto naše výsledky srovnávat s poznatky v ČR.

Druhý cíl: Ve stejné studii tj. na souboru 74 naivních nemocných s chronickou hepatitidou C jsme posuzovali vliv kouření na přítomnost a stupeň jaterní fibrózy. Kouření cigaret představuje zatím málo prostudovaný faktor progresu chronické virové hepatitidy C. V žádném nám dostupném sérovém markeru jaterní fibrózy není tento faktor obsažen. Prokázali jsme:

- Signifikantně vyšší výskyt stupně jaterní fibrózy F2 u kuřáků než u nekuřáků. Nicméně, podíl pacientů se stupněm fibrózy F2-F4 ve skupině kuřáků a nekuřáků se nelišil statisticky významně.
- Ve výsledcích sérových markerů jaterní fibrózy se kuřáci a nekuřáci statisticky významně nelišili. U Fibroindexu byla sice zjištěna nejvyšší hodnota signifikance, nicméně, ani ona nebyla statisticky významná. Zkoumáním parametru „kouření cigaret“ jsme chtěli ověřit, zda ovlivní výpovědní hodnotu sérových markerů jaterní fibrózy. Naše studie to nepotvrdila, nicméně parametr „kouření cigaret“ není podle našich znalostí obsažen v žádném markeru fibrózy a případná studie na souboru větším by mohla přinést výsledky signifikantnější.

Sekundární cíle:

První cíl: Zjistit histologicky verifikovaný stupeň jaterní fibrózy u naivních nemocných s chronickou hepatitidou C před zahájením kombinovanou léčbou interferonem a ribavirinem.

Podle histologických nálezů byli v našem souboru naivních nemocných s chronickou hepatitidou C před jejich léčbou pegylovaným interferonem a ribavirinem zastoupeni v největší míře pacienti bez fibrózy F0 (25,6%) nebo s časnou fibrózou F1 (51,3%). Tyto výsledky odpovídají poznatkům našich i zahraničních autorů. To, že skoro 76 % nemocných s chronickou virovou hepatitidou C přichází ve stádiích fibrózy F0-F1 je dobrou známkou všech těch, kteří se participují na včasné diagnostice choroby.

Druhý cíl: Zjistit vztah histologicky verifikovaného stupně jaterní fibrózy k terapeutickému výsledku-tedy dosažení setrvalé virologické odpovědi (SVR). Ta byla v naší studii sice prokázána častěji u nemocných bez fibrózy, nebo s nižším jejím stupněm ,tj. F0, F1 ev. F2, nicméně, rozdíl nebyl statisticky významný. To ale není v kontradikci k výsledkům jiných autorů, včetně našich, jejichž podobné studie byly provedeny na větších souborech a kteří prokázali statisticky významnou korelaci mezi stupněm fibrózy a dosažením SVR.

Třetí cíl: Zjistit vztahy mezi stupněm jaterní fibrózy prokázaným histologicky, věkem a předchozí drogovou závislostí nemocných s chronickou hepatitidou C. Jde o to, že přenos infekce virem hepatitidy C je nejčastěji při parenterální aplikaci drogy a někdejší toxikomani představují valnou část klientely pracovišť zabývajících se léčbou chronické hepatitidy C. Zjištěný stupeň fibrózy byl v naší studii u naivních nemocných s chronickou hepatitidou C nezávislý na věku, pohlaví a předchozí intravenosní toxikomanii.

Summary

In connection to planned targets of dissertation we came to the results:

Primary targets:

The first target:

In prospective study on the cohort of 74 naive patients with chronic hepatitis C we have investigated the specificity and sensitivity of some serum markers of liver fibrosis in correlation with the degree of liver fibrosis, which was assessed with histological examination of samples of liver tissue obtained by non-navigated percutaneous liver biopsy. The similar study has not been performed in our country.

We investigated the following 9 tests: AST/ALT, APRI, Fib4, Forns test, FibroTest, Fibrofast, Fibroindex, AP index and CDS. There are so called routine serum markers of liver fibrosis.

We chose them from the amount of the other ones used in the world, especially because of their particular components are routinely applied and the tests are cheap.

We have proven:

- tests APRI, Fib 4, Forns, FibroTest, Fibroindex, AP index and CDS are sufficiently specific and sensitive for identification of stage F3-F4 of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. These findings are in conformity with the results of other published studies.
- FibroTest and Fibroindex are able to differentiate fibrotic changes starting from the stage F2. This knowledge is very important for example for monitoring of patients with chronic hepatitis C. According to our results both tests are able to differentiate middle stage of liver fibrosis F2 from the high degree F3-F4. The results of published studies are both in conformity with our findings and also in discrepancy. But generally the small sensitivity and specificity of serum markers of liver fibrosis are the main reason, which disqualify them for routine application to the wide hepatology practise. But FibroTest and Fibroindex proved to be convenient for monitoring of middle and high stages of liver fibrosis in naive patients with chronic hepatitis C and we recommend their application at least in this indication to practise. From this point of view this knowledge originates in our country.
- CDS is significant for liver fibrosis.
- The early stages of fibrosis, and the difference between the F0 (the absence of fibrosis) and F1 (the mild degree of fibrosis) does not reflect any of the tests, which we

studied. But it is necessary to remind, that even the “gold standard” for diagnosis of liver fibrosis, i.e. the liver biopsy, may not quite exactly reflect its particular stages. It is caused by two factors. Although liver fibrosis is a diffusion process, the changes in different parts of liver may not be the same and secondly, the histological examination has a risk of interindividual mistake.

- If we compare our results with the knowledge of foreign authors, they support the application of serum markers of liver fibrosis in the routine practice of non-invasive monitoring of chronic hepatitis C. On the basis of our study we prefer markers FibroTest and Fibroindex.

In our country the similar study has not been performed and therefore it is not possible to compare our results with the findings in the Czech republic.

The second target:

In the same study i.e. in the cohort of 74 naive patients with chronic hepatitis C we assessed the influence of smoking on the presence and the stage of liver fibrosis. The cigarette smoking represents so far little examined factor of progression of the chronic viral hepatitis C. This factor is not included in any available serum test.

We have proven following:

- Significantly higher occurrence of stage F2 of liver fibrosis in smokers than in group of non-smokers. Nevertheless, the number of patients with fibrosis stage F2-F4 in group of smokers and non-smokers doesn't differ significantly in statistics.
- In results of serum markers of liver fibrosis smokers and non-smokers don't differ significantly in statistics. The highest level of significance was found in Fibroindex, but also this one was not statistically important. By investigation of parameter of „cigarette smoking“ we want to verify, if it can influence the evidence level of serum markers of liver fibrosis. Our study didn't confirm it, nevertheless parameter „cigarette smoking“ is not included in any fibrosis marker and any potential study on a bigger cohort could bring more significant results.

Secondary targets:

The first target: To find out the degree of liver fibrosis, which was described by histopathology expert, in naive patients with chronic hepatitis C before the initiation of combined therapy with interferon and ribavirin. According to histopathology findings the largest number of patients without fibrosis F0 (25,6%) or with early stage of fibrosis

F1(51,3%) participated in our study. The results correspond with our knowledge and with the knowledge of foreign authors. The fact that almost 76% of patients with chronic hepatitis C with fibrosis stage F0-F1 are willing to search for medical help is good for all, who participate in the early diagnosis of the disease.

The second target:

To find out the relation of histopathology verified degree of liver fibrosis and therapeutic results-the achievement of sustained virological response(SVR). The response was in our study proved more often in patients without fibrosis or with lower degree of fibrosis i.e. F0,F1 or F2, nevertheless, the difference was not statistically important. But it is not in opposition to results of other authors, inclusive our, their similar studies were performed in bigger cohorts and they proved statistically important correlation between fibrosis stage and SVR.

The third target: to find out the relations between degree of liver fibrosis described histopathologically, by age and by previous drug addiction in patients with chronic hepatitis C. The thing is that the transmission of infection of hepatitis C virus is the most often in parenteral application of drug and previous drug addicts represent the large majority of clients of departments which manage the treatment of chronic hepatitis C. The ascertained stage of fibrosis in our study in naive patients with chronic hepatitis C was independent on age, gender and previous intravenous drug addiction.

6. Závěr pro praxi

Jaterní fibróza je dnes již považovaná za reverzibilní a léčbou tedy ovlivnitelný proces ve vývoji chronického jaterního onemocnění. Její diagnostika se dosud opírá o histologický nález jaterní biopsie. Hledají se však cesty jiné, neinvazivní, k níž patří i sérové markery jaterní fibrózy. Ty z nich, tak zvané rutinní, jsme v disertační práci studovali a srovnávali s nálezy histologickými. Ukázaly se jako citlivé pro vyšší stadia jaterní fibrózy F3-F4. V naší práci jsme ale také prokázali, že testy FibroTest a Fibroindex jsou vhodné i pro monitorování stadií středních, tj. zejména F2. Doporučujeme tedy jejich zavedení do klinické praxe pro monitorování jaterní fibrózy zejména u nemocných s chronickou hepatitidou C. Představují snadnou, finančně dostupnou a z pohledu pacienta komfortní a nenáročnou metodu. Do budoucna by si zasloužily tyto metody větší uplatnění a oficiální uznání pro vyšetření jaterní fibrózy.

Dynamický rozvoj v diagnostice jaterní fibrózy lze v posledních letech vidět ve vývoji nových metod zobrazovacích a zejména v přístrojovém měření jaterní tuhosti. Nicméně, vlastní zkušenosti na tomto poli nemáme.

Téměř 80 % nemocných s naivní chronickou hepatitidou C bylo doporučeno k léčbě interferonem a ribavirinem ve stadiu bez fibrózy nebo ve stadiu lehké fibrózy. Je to příznivým vysvědčením pro lékaře, kteří jsou za včasnou diagnostiku chronické hepatitidy C odpovědní. Přitom, jak většina studií potvrdila, čím vyšší stupeň fibrózy, tím horší výsledky k dosažení SVR.

Ve studii se nám nepodařilo prokázat, že by kouření cigaret bylo rizikovým faktorem pro progresi fibrózy u nemocných s chronickou hepatitidou C. Nicméně stále dle studií jiných zůstává negativním faktorem nezávislým a obecně tedy lze jen naléhavě doporučit, aby nemocní s chronickou hepatitidou C nekouřili.

V naší studii byl přenos infekce HCV cestou parenterální aplikace drog zjištěn v 59,46%. Neprokázali jsme však, že by předchozí drogová závislost ovlivnila stupeň fibrózy ve srovnání s ostatními nemocnými. To jistě nemůže být ospravedlněním pro užívání drog a drogovou závislost.

7. Přehled literatury

1. Adams L, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, Greoge J, Kench J, Farrell G, McCaughan G. Hepascore: An accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clinical Chemistry*, Vol.51(2005), pp.1867-1873, ISSN: 0009-9147.
2. Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB. Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology*, 2006 May; 239(2):425-37.
3. Al-Ghamdi ASG. Complications of Liver Biopsy. In H. Takahashi. Liver biopsy. p.363-370. In *Tech*, Rijeka, 2011: 363-370.
4. Arthur MJ. Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatol*, 1995; Suppl 22: 43-48.
5. Attallah AM, Shiha GE, Omran MM, Zalata KR. A discriminant score based on four routine laboratory blood tests for accurate diagnosis of severe fibrosis and/or liver cirrhosis in Egyptian patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.*, 2006 Mar; 34(3):163-9.
6. Attalah AM, Zahran F, ismail H, Omran MM, El-Dosoky I, Shiha GE. Immunochemical identification and detection of serum fibronectin in liver fibrosis patients with chronic hepatitis C. *J Immunoassay Immunochem.*, 2007; 28(4):331-42.
7. Aubé C, Oberti F, Korali N, Namour MA, Loisel D, Tanguy JY, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Rifflet H, Maïga MY, Penneau-Fontbonne D, Caron C, Calès P. Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *J Hepatol.*, 1999; 30(3):472.
8. Bakir T, Mergen K, Telatar H, Karacadag S. Serum prolylhydroxylase activity in the clinical course of viral hepatitis. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 2:1, 57-59, 1989.
9. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *The American Journal of Surgical Pathology*, 1995; 1409-1417.
10. Becker L, Salameh W, Sferruzza A, Zhang K, ng Chen R, Malik R, Reitz R, Nasser I, Afdhal NH. Validation of Hepascore, compared with simple indices of fibrosis, in patients with chronic hepatitis C virus infection in United States. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2009; 7(6):696.
11. Bedossa P. Liver biopsy. *Gastroenterol Clin Biol.* 2008 Sep; 32(6 Suppl 1):4-7.
12. Benyon RC, Iredale JP. In Liver Fibrosis Reversible? *Gut*, 2000; 46: 443-446 (April).
13. Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta.*, 2002; 316(1-2):71.

14. Bonacini M, Hadi G, Govindarajan S, Lindsay KL. cirrhosis Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or in patients with chronic hepatitis C virus infection. *American Journal of Gastroenterology*, Vol. 92, No. 8, (August 1996), pp. 1302-4, ISSN: 0002-9270
15. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol*, 2008; 48 Suppl 1: s. 68-s92.
16. Braticevici CF, Papacocea R, Tribus L, Badarau A. Can we replace liver biopsy with non-invasive procedures? in *Liver Biopsy*, edited by Hirokazu Takahashi, 2011, p 225-240.. InTech, Rijeka.
17. Brenner DA, Waterboer T, Cho SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamanouchi M, Gillian A, Rippe RA. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol*, 2000; 32(Suppl 1): 32-38.
18. Bronfenmajer S, Schaffner F, Popper H. Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. *Arch Pathol*, 82, 1966: 447-453.
19. Bruno S., Silini E., Crosignani A. et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*, 25(1997), 754-758.
20. Burroughs AK, Cholongitas E. Non-invasive tests for liver fibrosis: Encouraging or discouraging results? *Journal of Hepatology*, 46(2007), p. 751-755.
21. Castera L. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatol Int.*, 2011; 5: 625-634.
22. Collazos J, Díaz F, Genollá J. Serum concentrations of laminin in cirrhosis of the liver. *Gut.*, 1993; 34(7): 974.
23. Colleta C, Smirne C, Fabris C, et al. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology*, 2005; 42: 838-45.
24. Davis GL, Lau JY. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology*, 1997, 26(Suppl 1), S122-S127.
25. Dinesen L., Caspary WF, Chapman RW, Dietrich CF, Sarrazin C, Braden B. 13C-methacetin-breath test compared to also noninvasive biochemical blood tests in predicting hepatic fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis C. *Digestive and Liver Disease*, 2008; 40(9): 743-748. Harbin WP, Robert NJ, Ferrucci JT Jr
26. Ehrmann J. *Ikterus*. Praha: Grada, 2008.
27. Ehrmann J., Jaterní fibróza a její možné léčebné ovlivnění. Aktuální gastroenterologie XXIII, Sborník přednášek, 2008.

28. Ehrmann J.jr., Aiglová K., Jaterní biopsie. V Ehrmann J., Hůlek P: Hepatologie, str 116-135. Praha: Grada, 2010.
29. Fabris P, Marranconi F, Bozzola L, Biasin MR, De Lazzari F, Plebani M, Benedetti P, Tositti G, Pellizzer G, Stecca C, de Lalla F. Fibrogenesis serum markers in patients with chronic hepatitis C treated with alpha-IFN. *J Gastroenterol.* 1999;34(3):345.
30. Faria SC, Ganesan K, Mwangi I, Shieh-morteza M, Viamonte B, Mazhar S, Peterson M, Kono Y, Santillan C, Casola G, Sirlin CB. MR imaging of liver fibrosis: Current state of the art. *October 2009 RadioGraphics*, 29, p. 1615-1635.
31. Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Naishadam D, Sterling RK, Su GL, Ghosh M, Wright EG, and the HALT-C Trial Group. Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C[†]. *Hepatology*, 2008, Mar;47(3):789-98.
32. Fontana, RJ, Kleiner DE, Bilonick, R, Terrault, N, Afdhal, N, Belle SH, Jeffers LJ, Ramcharran D, Ghany MG, Hoofnagle JH. Modeling hepatic fibrosis in African American and Caucasian American patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2006;44:925-935.
33. Fornis X, Ampuradanes S, Llovet J, Aponte J, Quintó L, Martínek-Bauer E. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*, Vol 36, No 4, (2002), pp. 986-992, ISSN: 0270-9139
34. Fortunato G, Castaldo G, Cerini R, Intrieri M, Gentile I, Borgia G, Piazza M, Salvatore F. Multivariate Discriminant Function Based on Six Biochemical Markers in Blood Can Predict the Cirrhotic Evolution of Chronic Hepatitis. *Clinical Chemistry*, Vol.47, No.9, (2001), pp.1696–1700, ISSN: 0009-9147
35. Friedmann SL. Liver fibrosis—from bench to bedside. *J. Hepatol*, 38(2003) p 38-53.
36. Friedrich-Rust M, Rosenberg W, Parkes J, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C. Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC Gastroenterol.*, 2010; 10: 103.
37. Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, Herrmann E. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 2008, Vol. 134, No.4(apr), 960-74
38. Friedrich –Rust M, Ong MF, Herrmann E, et al. Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;188:758-64.

39. Gallorini A, Plebani M, Pontisso P, Chemello L, Masiero M, Mantovani G, Alberti A. Serum markers of hepatic fibrogenesis in chronic hepatitis type C treated with alfa-2A interferon. *Liver*, 1994;14(5):257.
40. George DK, Ramm GA, Walker NI, Powell LW, Crawford DH. Elevated serum type IV collagen: a sensitive indicator of the presence of cirrhosis in haemochromatosis. *J Hepatol.* , 1999;31(1):47.
41. Giannini E, Caglieris S, Ceppa P, Risso D, Lantieri PB, Testa R. Serum pro-collagen III peptide levels are related to lobular necrosis in untreated patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 2001;13(2):137.
42. Giannini E, Risso D, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malfatti F, Romagnoli P, Testa E, Ceppa P, Testa R. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch Intern Med.* , 2003;163(2):218.
43. Gressner AM, Gao Ch., Gressner OA. Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver : A short survey. *World Journal Gastroenterol*, 2009, May 28;15(20):2433-2440.
44. Gressner AM, Tittor W, Kropf J. Evaluation of serum aminoterminal procollagen type III propeptide as an index of portal hypertension and esophageal varices in chronic liver diseases. *Clin Chim Acta.*, 1988;174(2):163.
45. Gronbaek K, Christensen PB, Hamilton-Dutoit S, et al. Interobserver variation in interpretation of serial liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* , 2002;9(6):443-9.
46. Grunhage F., Lammert F., Assessment of hepatic fibrosis in chronic viral hepatitis. In Mauss S., Berg T., J. Rockstroh, Ch. Sarrazin, H. Wedemeyer. *Hepatology.*, p. 291-293. Dusseldorf.: Flying Publisher. 2010. ISBN :978-3-924774-70-7
47. Guéchet J, Loria A, Serfaty L, Giral P, Giboudeau J, Poupon R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy. *J Hepatol.* , 1995;22(1):22.
48. Hahn, E. G., and D. Schuppan. 1987. Pathogenic mechanisms: fibrosis, fibrogenesis and fibrolysis, p. 63-81. In N. Tygstrup and F. Orlandi (ed.). *Cirrhosis of the liver: methods and fields of research*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1987.
49. Halfon P, Bourliere M, Deydier R, Botta-Fridlund D, Renou C, Tran A, Portal I, Allemand I, Bertrand JJ, Rosenthal-Allieri A, Rotily M, Sattonet C, Benderitter T, Saint Paul MC, Bonnot HP, Penaranda G, Degott C, Masseyeff MF, Ouzan D. Independent prospective

multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. *Am J Gastroenterol.*, 2006;101(3):547.

50.Hamizah R.,Nurhayaty M.,Mei-Ling ST, Azhar-Shah S., Tze-Zen O., SanjivM., Diagnostic Value of the 13 C Methacetin Breath Test in Various Stages of Chronic liver Disease. *Gastroenterol Res Pract.*, 2011;2011:235796.

51.Harada K, Shiota G, Kawasaki H. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver.*, 1999;19(4):318.

Harbin WP, Robert NJ, Ferrucci JT Jr. Diagnosis of cirrhosis based on regional changes in hepatic morphology: a radiological and pathological analysis. *Radiology*, 1980;135(2):273.

52.Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, Saisho H. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996;24(5):1058.

53. Herrine SK, Friedman LS. Divining the role of liver biopsy in hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 43(2005) ,374-376.

54.Hezode C, Lonjon I, Roudot-Thoraval F, Mavrier JP, Pawlotsky JM,Zafrani ES, et al. Impact of smoking of histological liver lesions in chronic hepatitis C. *Gut*, 2003;52:126-129.

55.Iacobellis A.,Fussili S,Magnia A, Clemente R,Festa V,Giaccobe A, Facciorusso D,Niro G,Conoscitore A. Ultrasonographic and biochemical parameters in the non-invasive evaluation of liver fibrosis in hepatitis C virus chronic hepatitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* ,Vol. 22,No.9,(November 2005),pp.:769-74, ISSN: 0269-2813

56. Imbert-Bismut F,Ratziu V,Pieroni L,Charlotte F,Benhamou Y,Poynard T.Biochemical markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a prospective study. *The Lancet*, vol.357, April 7,2001.

57.Islam S, Antonsson L, Westin J, Lagging M. Cirrhosis in hepatitis C virus-infected patients can be excluded using an index of standart biochemical serum markers.*Scand J Gastroenterol*, 2005;40: 867-872.

58.Ito T, Shibasaki S. Electron microscopic study on the hepatic sinusoidal wall and the fat-storing cells in the normal human liver. *Arch Histol Jpn* , 29, 1968:137-192.

59.Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, PricePA, Henriksen JH,Carbarsch C, Bendtsen F. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *Journal of Hepatology*, 2000;32:911-920.

60.Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Naito M, Miyamoto T, Inoue A, Asai A, Hijioka T, Fusamoto H, Kamada T.

Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* , 1997;26(3):574.

61.Kelleher T, Mehta S, Bhaskar R, Sulkowski M, Astemborski J., Thomas DL. *et al.*, Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index, *Journal of Hepatology*, Vol.43, (2005), pp. 78–84, ISSN: 0168-8278

62.Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.*, 2007;45(2):297.

63.Körner T, Kropf J, Gressner AM. Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *J Hepatol.*, 1996;25(5):684.

64.Körner T,Kropf j,Kosche B, Kristahl H, Jaspersen D, Gressner AM. Improvement of prognostic power of the Child-Puhg classification of liver cirrhosis by hyaluronan. *Journal of hematology*, 39(2003)947-953.

65.Kropf J. Efficacy of serum Laminin Measurement for Diagnosis of Fibrotic Liver Disease. *Clinical Chemistry*, Vol. 34, No.10,(1998), pp.2026-2030, ISSN: 0009-9147

66.. Kupcova V, Valkova M, Turecky L, Szantova M. Serum hyaluronic acid as a marker of hepatic fibrosis in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol* , 2002;36(Suppl 1):57.

67.Lackner C,Struber G,Liegl B,Leibl S,Ofner P,Bankuti C,Bauer B,Stauber RE. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C[†] *Hepatology*, Volume 41, Issue 6, pages 1376–1382, June 2005.

68.Leroy V, Hilleret M-N, Sturm N, Trocme C, Renversez J-C,Faure P, et al. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.*, 2007;46:775–782.

69.Lewin M,Poujol –Robert A,Boelle PY,Wendum D,Lasnier E,Wiallon M ,Guéchet J,Hoeffel C,Arrive L,Tubiana JM, Poupon R. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for the assessment of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2007;46(3):658-665.

70.Lin ZH, Xin YN, Dong QJ, Wang Q, Jiang XJ, Zhan SH, Sun Y, Xuan SY. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis. *Hepatology*, 2011;53(3):726-731. Lu I, Zhou K. Noninvasive alternatives for the assessment of liver fibrosis. from Liver Biopsy,edited by Hirokazu Takahashi,2011, p 251-264. InTech, Rijeka.

72. Lukl. P. Hepatitis, zánět jater. ed. *Vnitřní lékařství*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1965; s. 657 – 668

73. McHutchinson JG (2004) "Understanding hepatitis C". *Am J Manag Care*, 10(2 Suppl):S21-9.
74. Milani S, Grappone C, Pellegrini G, Schoppa D, Herbst H, Calabro A, Casini A, Pinzani M, Surrenti C. Undulin RNA and protein expression in normal and fibrotic human liver. *Hepatology*. 1994 Oct;20(4 Pt 1): 908-16.
75. Montgomery Bissell D, Maher JJ. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In Zakim D, Boyer TD. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. Third edition. W.B. Saunders Company, 1996, p.506-525.
76. Morikawa H, Kawada N. The current status of non-invasive assessment of liver fibrosis: real time tissue elastography. in *Liver Biopsy*, edited by Hirokazu Takahashi, 2011, p 240-250.. In *Tech*, Rijeka.
77. Naveau S, Gaudé G, Asnacios A, Agostini H, Abella A, Barri-Ova N, Dauvois B, Prévot S, Ngo Y, Munteanu M, Balian A, Njiké-Nakseu M, Perlemuter G, Poynard T. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*., 2009;49(1):97.
78. Naveau S., Poynard T, Benattar C, Bedossa P, Chaput JC. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis, Diagnostic interest. *Dig Dis Sci*, 1994 Nov; 39(11):2426-32.
79. Nelson DR, Gonzalez-Peralta RP, Qian K, Xu Y, Marousis CG, Davis GL, Lau JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*, 1997;4(1):29.
80. Niemelä O, Risteli J, Blake JE, Risteli L, Compton KV, Orrego H. Markers of fibrogenesis and basement membrane formation in alcoholic liver disease. Relation to severity, presence of hepatitis, and alcohol intake. *Gastroenterology*. , 1990;98(6):1612.
81. Palmeri ML, Wang MH, Rouze NC, Abdelmalek MF, Guy CD, Moser B, Diehl AM, Nightingale KR. Noninvasive evaluation of hepatic fibrosis using acoustic radiation force-based shear stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 2011, vol. 55, p. 666-672.
82. Parés A, Deulofeu R, Giménez A, Caballería L, Bruguera M, Caballería J, Ballesta AM, Rodés J. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology*. , 1996;24(6):1399.
83. Park G, Linn B, Ngu MC, Jones DB, Katelaris PH. Aspartate aminotransferase:alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: Is it a useful predictor of cirrhosis? *Journal of gastroenterology and Hepatology*, (2000)15,386-390.
84. Patel K, Gordon S.C, Jacobson I, Hézode Ch, Smith K.M, Pawlotsky J-M, Mc-Hutchinson J.G. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-

- to-advanced liver fibrosis chronic hepatitis C patients. *Journal of Hepatology*, Vol.41, No.6,(December 2004),pp. 935-942,ISSN: 0168-8278
- 85.Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, et al. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2001;34:121-125.
- 86.Petz D, Klauck S, Rohl FW, Malfertheiner P, Roessner A,Rocken C. Feasibility of histological grading and staging of chronic viral hepatitis using specimen obtained by thin-needle biopsy. *Virchows Arch* , 2003;442(3): 238-44.
- 87.Piccinino F,Sagnelli F,Pasquale G,Giusti G. *Complications following percutaneous liver biopsy*.
A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol* , 1986;2(2):165-73.
- 88.Poupon R,Poupon RE. Primary Biliary Cirrhosis. In Zakim D,Boyer TD. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*.Third edition. W.B.Saunders Company,1996, p.1334.
- 89.Poynard T,Aubert A, Bedossa P, Abella A,Naveau S, Paraf F, Chaput JC.A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology*, Vol.100,(May 1991),pp.1397-402, ISSN: 0016-5085
- 90.Poynard T,RatzuV,Naveau S,Thalud D,CharlotteF, Messous D,Capron D,Abella A. The diagnostic value of biomarkers(SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comparative Hepatology* ,Vol.4,No.10,(December2005), ISSN: 1476-5926
91. Poynard T,Ratzu V,Charlotte F,MessousD, Munteanu M,Imbert-Bismut F.Diagnostic value of biochemical marker(NashTest) for prediction of nonalcoholo steatohepatitis in patients with non alcoholic fatty liver disease.*BMC Gastroenterology* ,Vol. 6,No.34,(November 2006), ISSN: 1471-230X.
- 92.Poynard T., Bedosa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*, 1997; 349; 825 – 832.
- 93.Rieder H,Armbrust T,Meyer-zum Buschenfelde KH,Ramadori G.Contribution of sinusoidal endothelial liver cells to liver fibrosis:expresion of transforming growth factor beta 1 receptors and modulation of plasmin-generating enzymes by transforming growth factor beta 1. *Hepatology*, 1993: 937-944.
- 94.Roholm. K., Iversen P. Changes in the liver in acute epidemic hepatitis (catarrhal jaundice) based on 38 aspiration biopsie. *Acta Path Microbiol Scan*, 1939; 16; 427.

95. Ronot M., Asselah T., Paradis V., Michoux N., Dorvilius M., Baron G., Marcellin P., Van Beers BE, Vilgrain V. Liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection: differentiating minimal from intermediate fibrosis with perfusion Ct. *Radiology*, 2010 Jul ;135-42.
96. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology*, Vol.127,(2004,)pp.1704–13, ISSN: 0016-5085
97. Rossi E, Adams L, Prins A, Bulhara M, De Boer B, Garas G, Mac Quillan G, Speers D, Jeffrey G. Validation of the FibroTest biochemical Markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clinical Chemistry*, Vo.49, No.3, (2003), pp.450-454, ISSN: 0009-9147.
98. Saitou Y et al., Noninvasive estimation of hepatic fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, Vol.11 No.4,(2005), pp. 476-481, ISSN: 1007-9327
99. Sandrin L, Oudry J, Bastard C, Fournier C, Miette V, Mueller S. Non-invasive assessment of liver fibrosis by vibration-controlled transient elastography (Fibroscan). From Liver Biopsy, edited by Hirokazu Takahashi, 2011, p.293-314, InTech, Rijeka.
100. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol.*, 1998;93(1):44.
101. Shiha G, Sarin SK, Ibrahim AE, Omata M, Kumar A, Lesmana AE, Leung N, Tozun N, Hamid S, Jafri W, Maruyama H, Bedossa P, Pinzani M, Chawla Y, Esmat G, Doss W, Elzanaty T, Sakhuja P, Nasr AM, Omar A, Wai CW, Abdallah A, Salama M, Hamed A, Yousry A, Waked I, Elshahar M, Fateen A, Mogawer S, Hamdy H, Elwakil R and Jury of the APASL Consensus Development Meeting 29 January 2008 on Liver Fibrosis With or Without Hepatitis B or C. Liver fibrosis: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). *Hepatol Int.*, 2009 June; 3(2): 323–333.
102. Shoukat A., Qamar J., Amir O. “Liverscore“ is predictive of both liver fibrosis and activity in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*, 2011 November 7;17(41):4607-4613.
103. Scherlocková S., Dooley J.. Nemoci jater a žlučových cest. Překlad jedenáctého vydání. Praha: 2004, s. 37-45, s.366-367
104. Schneiderka P. Markery jaterní fibrózy. *Klin. Biochem. Metab.*, 16 (37), 2008, No. 1, p. 14–18.
105. Schuppan D, Gressner AM. Function and metabolism of collagens and other extracellular matrix proteins. 381-406. In Bircher J, Benhamon JP, Rodes J (Eds). *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, 1999, p. 381-406.
106. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, Sulkowski M, Torriani FJ, Dieterich DT, Thomas DL, Messinger D, Nelson M, APRICOT Clinical

Investigators. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.*, 2006;43(6):1317.

107.Sud A., Hui JM, Farrell GC. Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology*, Vol.39, No.5, (May 2004), pp. 1239-1247, ISSN: 0270-9139

108.Taimr P. Fibróza jater. In Špičák J. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*, s. 8-83. Praha: Grada, 2007.

109.Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology.* , 1995;21(3):787.

110.Teare JP, Sherman D, Greenfield SM, Simpson J, Bray G, Catterall AP, Murray-Lyon IM, Peters TJ, Williams R, Thompson RP. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet.* 1993;342(8876):895.

111.Terjung B, Lemnitzer I, Dumoulin FL, Effenberger W, Brackmann HH, Sauerbruch T, Spengler U. Bleeding complications after percutaneous liver biopsy. An analysis of risk factors. *Digestion* , 2003;67(3):138-45.

112.Testa R, Testa E, Giannini E, Borro P, Milazzo S, Isola L, Ceppa P, Lantieri PB, Risso D. Noninvasive ratio indexes to evaluate fibrosis staging in chronic hepatitis C: role of platelet count/spleen diameter ratio index. *Journal of Internal Medicine*, 2006;260:142-150.

113.Thabut D., Simon-Rudler M. Biomarkers of liver fibrosis. In *Liver Cirrhosis: From Pathophysiology to Disease Management*. P. 155-162. Dordrecht : Springer and Falk Foundation, e.V.2008.

114.Thabut D, Simon M, Myers RP, Messous D, Thibaut V, Imbert-Bismut F, Poynard T. Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis C (letter). *Hepatology*, 2003;37:1220-21

115.Turecky L, Uhlíkova E, Rendekova V, Kupcova V, Krizko J. N-acetylglukozaminidáza v sére pacientov s ochoreniami pečene. *Čs Gastroenterol Výž* , 1985;39:200-201.

116.Turecky L, Kupcova V, Szantova M, Uhlíkova E. Alpha-2-macroglobulin as a biochemical marker of fibrosis in patients with chronic viral hepatitis. *Biomed Papers* , 2003;147 (Suppl 1):48-49.

117.Ueno T, Tamaki S, Sugawara H, Inuzuka S, Torimura T, Sata M, Tanikawa K. Significance of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in various liver diseases. *J Hepatol.* , 1996;24(2):177.

118. Urbánek P. Infekce virem hepatitidy C. Praha: Galén, 2004, s. 19-20, 46-49.
119. Urbánek P, Husa P. Virová hepatitida C. In Ehrmann J, Hůlek P. *Hepatologie*. Praha: Grada, 2010, s. 239-242.
120. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, Fontaine H, Pol S. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*, 2007;46(1):32.
121. Valkova M., Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy*, 2002;103(2):76-85.
- Vozar I. Serum laboratory markers for noninvasive diagnosis and monitoring of liver fibrogenesis in patients with chronic liver diseases. *Bratisl Lk Listy*, 2005;106(3):123-126.
122. Wai C, Greenson J, Fontana R, Kalbfleisch J, Marrero J, Conjeeveram H, Lok A. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, Vol. 38, No. 2, (2003), pp. 518-526, ISSN: 0270-9139
123. Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci*, 1999;44(3):624.
124. Yabu K, Kiyosawa K, Mori H, Matsumoto A, Yoshizawa K, Tanaka E, Furuta S. Serum collagen type IV for the assessment of fibrosis and resistance to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol.*, 1994;29(5):474.
125. Yamauchi M, Mizuhara Y, Maezawa Y, Toda G. Serum tenascin levels in chronic liver disease. *Liver*, 1994, Jun;14(3):148-53.
126. Yokoya Y, Iwata K, Muragaki Y, Shiota C, Morimoto Y, Inoue M, Itoh H, Nishioka S, Ooshima A. Concentration of serum laminin and type IV collagen in liver diseases assayed by a sandwich enzyme-immunoassay using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta.*, 1992;210(1-2):109.
127. Zein C.O. Clearing the smoke in chronic liver disease. *Hepatology*, 2010;51(5):1487-1490