



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej

Joanna Górka-Dynysiewicz

**PENTRAKSYNA 3 W MODELU WŁASNYM OCENY ZAAWANSOWANIA WŁÓKNIENIA
WĄTROBY U CHORYCH Z PRZEWLEKŁYM WIRUSOWYM ZAPALENIEM WĄTROBY
TYPU C**

**PENTRAXIN 3 IN MODEL FOR ASSESSING THE STAGE OF LIVER FIBROSIS IN PATIENTS
WITH CHRONIC HEPATITIS C**

Rozprawa doktorska

oparta o cykl powiązanych ze sobą publikacji
w dyscyplinie nauk farmaceutycznych

Promotor rozprawy: dr hab. Jolanta Zuwała-Jagiełło

Promotor pomocniczy: dr n. med. Monika Pazgan-Simon

Wrocław 2020

Wprowadzenie. Głównym elementem progresji przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (ang. *chronic hepatitis C*; CHC) jest proces włóknienia (fibrogenaza), patologiczna regeneracja tkanki wątrobowej poprzez tkankę łączną. W podejmowaniu decyzji terapeutycznych u chorych z CHC niezbędna jest wiedza o stopniu zaawansowania włóknienia. Do niedawna w praktyce klinicznej do monitorowania aktywności martwiczo-zapalnej i zaawansowania włóknienia w przebiegu CHC wykorzystywano oznaczanie aktywności aminotransferaz w surowicy krwi i ocenę histopatologiczną biopsjatu wątroby. W erze spersonalizowanej medycyny, gdzie ważne jest monitorowanie postępu lub regresji włóknienia w przebiegu CHC, przy stosowaniu bezpośrednio działających leków przeciwwirusowych (ang. *Direct Acting Antiviral*, DAA), do określenia stadium włóknienia coraz częściej wykorzystywane są nieinwazyjne dwu- lub wieloparametrowe modele diagnostyczne. Służą one do klinicznego zarządzania pacjentami w aspekcie oceny odpowiedzi na leczenie, danych dotyczących leczenia oraz danych laboratoryjnych. Istnieje wyraźna potrzeba tworzenia nowych wskaźników biochemicznych nienależących do rutynowych paneli diagnostycznych, lecz odgrywających istotną rolę w patogenezie włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C. Do takich wskaźników należy pentaksyna 3 (PTX3) - syntetyzowana lokalnie w miejscu uszkodzenia tkanki wątrobowej odpowiada za aktywację komórek gwiaździstych, kluczowy etap w procesie włóknienia.

Cel badań. Badanie własne miało na celu opracowanie nieinwazyjnego modelu diagnostycznego z uwzględnieniem PTX3 do oceny stopnia włóknienia u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C z zastosowaniem zaawansowanych metod matematycznych. Dla realizacji celu głównego ustalono następujące cele szczegółowe: (1) określenie udziału PTX3 w patogenezie CHC w porównaniu z pośrednimi biomarkerami procesu włóknienia [tj transformujący czynnik wzrostu- β_1 (TGF- β_1); kwas hialuronowy (HA)]; (2) porównanie przydatności diagnostycznej PTX3 z uznanymi modelami oceniającymi zaawansowanie zmian zapalnych i stopień włóknienia; (3) opracowanie i określenie przydatności diagnostycznej wieloparametrowego modelu *Pentra score* opartego na PTX3 i rutynowych parametrach biochemicznych do oceny istotnego włóknienia wątroby ($F \geq 2$); (4) walidacja własnego modelu *Pentra score* na niezależnej grupie pacjentów z CHC.

Pacjenci i metody. Badaniem objęto 282 osób, tj. 242 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C oraz 40 zdrowych ochotników. Analiza wstępna miała na celu poszukiwanie korelacji pomiędzy potencjalnymi zmiennymi diagnostycznymi, tj. PTX3, TGF- β_1 , i HA a wartością punktową oceny stopnia włóknienia oraz porównanie median tychże zmiennych w grupie pacjentów z istotnym ($F \geq 2$) i zaawansowanym stopniem ($F \geq 3$) włóknienia.

Model matematyczny do identyfikacji istotnego włóknienia został opracowany przy użyciu grupy treningowej (n=150), a następnie sprawdzony na niezależnej grupie walidacyjnej (n=92) z przewlekłym CHC. Istotne zmienne z analizy jednowymiarowej zostały następnie włączone do wielowymiarowej analizy regresji. Zmienną objaśnianą w modelu logistycznym stanowiło istotne włóknienie (zmienna dychotomiczna o wariantach $F < 2$ i $F \geq 2$), a potencjalne zmienne objaśniające stanowiły parametry biochemiczne surowicy krwi z dnia wykonania biopsji. Stężenie PTX3, TGF- β_1 i HA oznaczono za pomocą komercyjnie dostępnych testów ELISA (odpowiednio *Cloud-Clone Corp.*, Houston, USA i *Echelon Biosciences*, Salt Lake City, USA). U wszystkich pacjentów wykonane były podstawowe oznaczenia biochemiczne i dokonano oceny histopatologicznej biopsji wątroby oraz pomiaru sztywności wątroby za pomocą przejściowej elastografii.

Wyniki. Wykazano istotny wzrost surowiczego stężenia PTX3 wraz ze wzrostem aktywności martwiczo-zapalnej (korelacja z zaawansowaniem zmian zapalnych w skali METAVIR ($\rho = 0.58$, $P < 0.001$) i ze stadium histologicznym włóknienia wątroby ($\rho = 0.64$, $P < 0.001$). Analiza wielowymiarowa wykazała, że wiek ($P < 0.001$), stężenie pentraksyny 3 ($P < 0.01$), stosunek γ -glutamylotranspeptydazy (GGTP) do liczby płytek krwi (PLT) ($P < 0.1$) oraz stężenie HA ($P < 0.1$) były niezależnymi predyktorami istotnego włóknienia. Współczynnik determinacji wieloparametrowego modelu własnego [**$Pentra\ score = 0.176 \times PTX3\ (ng/ml) + 0.522 \times HA\ (ng/ml) + 0.29 \times GGTP\ (IU/L) + 0.14 \times PLT\ (\times 10^9/L) + 0.14 \times\ wiek\ (lata) - 3.9346$**] skonstruowanego do punktowej oceny istotnego włóknienia ($F \geq 2$) w oparciu o analizę regresji logistycznej (krokową postępującą) wykorzystującą rutynowe parametry biochemiczne i PTX3 wyniósł 85.4%. Wartość pola pod krzywą ROC dla modelu *Pentra score* do przewidywania istotnego włóknienia $F \geq 2$ w grupie treningowej i walidacyjnej wynosiła odpowiednio 0.894 i 0.867. Dokładność diagnostyczna *Pentra score* była najwyższa w obu grupach (odpowiednio 90.6% i 87.0%) do oceny zaawansowania włóknienia wątroby, przy porównaniu z uznanymi modelami (tj. *APRI index*, *FIB-4 score*, *Forns index*) w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C.

Wniosek. Wieloparametryczny model *Pentra score* z udziałem pentraksyny 3 oceniający zaawansowanie włóknienia u chorych z CHC cechuje się umiarkowaną swoistością, ale 100% czułość diagnostyczna daje podstawę do wykorzystania go w praktyce klinicznej.

Pentraxin 3 in novel model for the evaluation of the degree of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis C.

Introduction. The main element of the progression of chronic viral hepatitis C (CHC) is the process of fibrosis, a pathological regeneration of liver tissue with the participation of connective tissue. In order to choose proper therapeutic strategy in patients with CHC, the knowledge concerning the degree of fibrosis is essential. Until recently, to monitor the necroinflammatory activity and the degree of fibrosis in CHC course in clinical practice, serum aminotransferases activity and the histopathological assessment of liver biopsy were used. In the era of personalized medicine, where monitoring of the progression or regression of fibrosis during therapy with the use of Direct Acting Antiviral (DAA) agents is of great importance, one- or multiparametric diagnostic models are more and more often used. They are employed for clinical management of patients in terms of assessing treatment response. There is an explicit need to create new biochemical indicators which are not part of routine diagnostic panels, but play an important role in fibrosis pathogenesis in the course of CHC. One of this indicators is pentraxin 3 (PTX3) - locally synthesized at the site of liver tissue damage, responsible for activation of hepatic stellate cells, which is a key stage in the process of fibrosis.

The aim of the study. Study aim was to develop a noninvasive diagnostic model including PTX3 to assess the degree of fibrosis in patients with chronic viral hepatitis C with the use of advanced mathematical methods. To fulfill the main purpose, the following specific aims were established: (1) determination of the role of PTX3 in the pathogenesis of CHC in comparison to indirect biomarkers of the fibrosis process [i.e. transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1); hyaluronic acid (HA)]; (2) comparison of the diagnostic utility of PTX3 with the acknowledged models assessing the severity of inflammatory changes and the fibrosis degree; (3) development and determination of diagnostic usefulness of the multiparameter Pentra score model based on PTX3 and routine biochemical parameters for assessment of significant liver fibrosis ($F \geq 2$); (4) validation of novel Pentra score model in independent patients group with chronic viral hepatitis C.

Patients and methods. The study included 282 subjects, i.e. 242 patients with chronic viral hepatitis C and 40 healthy volunteers. The preliminary analysis was performed to search for correlations between potential diagnostic variables, i.e. PTX3, TGF- β 1, and HA, and the point value of fibrosis assessment and compare the medians of these variables in the groups of patients with significant ($F \geq 2$) and advanced ($F \geq 3$) fibrosis. A mathematical model for identification of significant fibrosis was developed with the use of training group ($n = 150$), and

then examined in independent validation group (n = 92) in patients with chronic viral hepatitis C. Significant variables from one-dimensional analysis were then included into multidimensional regression analysis. Response variable in the logistic model was significant fibrosis (dichotomic variable with variants $F < 2$ and $F \geq 2$), and the potential explanatory variables were the serum biochemical parameters from the day of the biopsy. Model was based on logistic regression analysis. PTX3, TGF- β_1 , and HA concentrations were examined with the use of commercially available ELISA tests (accordingly, Cloud-Clone Corp., Houston, USA, and Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA). Basic biochemical analyses, histopathological assessment of liver biopsy, as well as liver stiffness measurement with the use of transient elastography were performed in all patients.

Results. A significant increase in serum PTX3 concentration with an increase in necroinflammatory activity (correlation with the degree of inflammatory lesions on the METAVIR scale - $\rho = 0.58$, $P < 0.001$), and with the histological stage of liver fibrosis ($\rho = 0.64$, $P < 0.001$) was demonstrated. Multidimensional analysis showed that age ($P < 0.001$), pentraxin 3 concentration ($P < 0.01$), γ -glutamyltranspeptidase (GGTP) to platelet count (PLT) ratio ($P < 0.1$), and HA concentration ($P < 0.1$) were independent predictors of significant fibrosis. Coefficient of determination of multiparameter model [***Pentra score*** = $0.176 \times \text{PTX3 (ng/ml)} + 0.522 \times \text{HA (ng/ml)} + 0.29 \times \text{GGT (IU/L)} + 0.14 \times \text{age (years)} - 3.9346$] established for score assessment of significant fibrosis ($F \geq 2$) with the use of routine biochemical parameters and PTX3 was 85.4%. The area under the ROC curve for the *Pentra score* model for prediction of significant fibrosis ($F \geq 2$) in the training and validation group was 0.894 and 0.867, respectively. The diagnostic accuracy of the *Pentra score* was the highest in both groups (90.6% and 87.0%, respectively) when compared with acknowledged models for the assessment of liver fibrosis severity (i.e. APRI index, FIB-4 score, Forns index) in patients with chronic viral hepatitis C.

Conclusion. The multiparameter *Pentra score* model with pentraxin 3, evaluating the severity of fibrosis in patients with CHC is characterized by moderate specificity, but 100% diagnostic sensitivity provides the basis for its use in clinical practice.