

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tanja SELIČ KURINČIČ

**VPLIV FLUVASTATINA NA UČINKOVITOST
ZDRAVLJENJA KRONIČNEGA HEPATITISA C
S PEGILIRANIM INTERFERONOM α
IN RIBAVIRINOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tanja SELIČ KURINČIČ

**VPLIV FLUVASTATINA NA UČINKOVITOST ZDRAVLJENJA
KRONIČNEGA HEPATITISA C S PEGILIRANIM
INTERFERONOM α IN RIBAVIRINOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IMPACT OF ADDED FLUVASTATIN TO PEGYLATED
INTERFERON α /RIBAVIRIN ON SUSTAINED VIROLOGICAL
RESPONSE IN CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 12. 11. 2009 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje mikrobiologije. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Gorazd Lešničar, dr. med. in za somentorico izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr. med..

Doktorsko delo je zaključek univerzitetnega podiplomskega študija Biomedicine, področje mikrobiologije, na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Klinična raziskava je potekala na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, na Oddelku za nalezljive bolezni in vročinska stanja Splošne bolnišnice Celje in na Oddelku za nalezljive bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Maribor.

Mentor: izr. prof. dr. Gorazd Lešničar, dr. med.

Somentorica: izr. prof. dr. Mojca Matičič, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mario POLJAK, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: izr. prof. dr. Mojca MATIČIČ, dr. med.

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja

Član: izr. prof. dr. Gorazd LEŠNIČAR, dr. med.

Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za nalezljive bolezni in vročinska stanja

Datum zagovora: 18. 4. 2014

Delo je rezultata lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Doktorandka

Tanja Selič Kurinčič, dr. med.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 616.36-002:615.2.036(043)=163.6
- KG kronični hepatitis C/zdravljenje/klinične raziskave/statini/fluvastatin/pegilirani interferon alfa/ribavirin
- AV SELIČ KURINČIČ, Tanja, dr. med.
- SA LEŠNIČAR, Gorazd (mentor)/MATIČIČ, Mojca (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicine, področje mikrobiologija
- LI 2014
- IN VPLIV FLUVASTATINA NA UČINKOVITOST ZDRAVLJENJA KRONIČNEGA HEPATITISA C S PEGILIRANIM INTERFERONOM α IN RIBAVIRINOM
- TD Doktorska disertacija
- OP XII, 98 str., 15 pregl., 10 sl., 2 pril., 175 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Kombinacija pegiliranega interferona alfa in ribavirina predstavlja standardno kombinacijo (SOC) za zdravljenje kroničnega hepatitisa C (CHC), ki privede do trajnega virološkega odziva (SVR) v 41-52 % pri okužbi z genotipom virusa hepatitisa C (HCV) 1 in v 73-79 % pri okužbi z genotipom HCV 3. Nekatere klinične raziskave so potrdile zvečano učinkovitost zdravljenja s kombinacijo fluvastatina (FLU) in SOC. Poglavitni namen naše raziskave je bil ugotoviti učinkovitost kombinacije FLU in SOC pri bolnikih z genotipoma 1 in 3 in oceniti varnost FLU pri bolnikih s CHC. Prospektivna raziskava je vključevala 179 naivnih bolnikov s CHC. V preiskovani skupini so bolniki prejeli FLU 80 mg dnevno in SOC. Bolniki v historični kontrolni skupini, ki so bili primerljivi z bolniki v preiskovani skupini po spolu, starosti in genotipu, so bili zdravljeni samo s SOC. Virološki odzivi v obdobjih med zdravljenjem in SVR se niso razlikovali med obema skupinama, razen pri bolnikih z genotipom 1 in visoko plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml). V tej podskupini so bolniki v preiskovani skupini dosegli SVR v 75 % v primerjavi s kontrolni skupino, v kateri je bil SVR 41 %, razlika je bila statistično značilna ($p=0,024$). Kombinacija FLU in SOC je pri bolnikih z genotipom 1 in visoko plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml) tudi statistično značilno zmanjšala delež bolnikov s ponovitvijo bolezni. Bivariatna in multivariatna statistična analiza sta pokazali, da so okužba z genotipom HCV 3 ($p<0,001$), starost bolnika ob začetku zdravljenja ≤ 40 let ($p<0,001$), steatoza <5 % ($p=0,01$) in nizka plazemska viremija (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml) ($p<0,001$) statistično značilno pomembni napovedni kazalci za dosego SVR. V raziskavi smo potrdili, da je raba FLU pri bolnikih s CHC varna.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 616.36-002:615.2.036(043)=163.6
- CX chronic hepatitis C/treatment/clinical trials/statins/fluvastatin/pegylated interferon alpha/ ribavirin
- AU SELIČ KURINČIČ, Tanja, MD
- AA LEŠNIČAR, Gorazd (supervisor)/MATIČIČ, Mojca (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Study Programme in Biomedicine, Field Microbiology
- PY 2014
- TI IMPACT OF ADDED FLUVASTATIN TO PEGYLATED INTERFERON α /RIBAVIRIN ON SUSTAINED VIROLOGICAL RESPONSE IN CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS
- DT Doctoral dissertation
- NO XII, 98 p., 15 tab., 10 fig., 2 ann., 175 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The combination of pegylated interferon α and ribavirin is a standard-of-care (SOC) treatment for chronic hepatitis C (CHC) with sustained virological response (SVR) being achieved in 41-52% of patients infected with genotype 1 and in 73-79% of patients with genotype 3. In a few clinical trials combination of fluvastatin (FLU) and SOC increased SVR. The aims of this study was to investigate the impact of added FLU to SOC on SVR in patients infected with genotypes 1 and 3 and to investigate the safety of FLU in chronic hepatitis C patients. The prospective study enrolled all together 179 naive CHC patients. In the FLU group of patients was treated with the combination of FLU 80 mg daily and SOC, historical controls matching the study group in genotype, age and gender, were treated with SOC only. On-treatment viral responses as well as SVR did not differ significantly between the two groups, except for the genotype 1 patients with high viral load (HCV RNA >400,000 IU/ml) presenting significantly higher SVR rate in the FLU group (75%) compared to the control group (41%) ($p=0.024$). Beside, the combination of FLU and SOC significantly reduced viral relapse rate in patients with CHC genotype 1 and high viral load (HCV RNA >400,000 IU/ml) but not in genotype 1 patients with low baseline viral load and in genotype 3 patients. Bivariate and multivariate logistic regression identified that HCV genotype 3 infection ($p<0.001$), patients ≤ 40 years old ($p<0.001$), steatosis <5% ($p=0.01$) and low viral load (HCV RNA $\leq 400,000$ IU/ml) ($p<0.001$) were being associated with higher odds of SVR. In the present study FLU use in patients with CHC proved to be safe.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZI	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA C	3
2.2 VIRUS HEPATITISA C	4
2.2.1 Zgradba virusa hepatitisa C	4
2.2.2 Življenjski krog virusa hepatitisa C	6
2.3 OKUŽBA Z VIRUSOM HEPATITISA C	7
2.3.1 Načini okužbe	7
2.3.2 Naravni potek okužbe z virusom hepatitisa C	8
2.4 DIAGNOSTIKA OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA C	10
2.4.1 Mikrobiološke preiskave	10
2.4.2 Patohistološka diagnostika	12
2.5 ZDRAVLJENJE KRONIČNEGA HEPATITISA C	13

2.5.1	Zgodovina zdravljenja kroničnega hepatitisa C	13
2.5.2	Sodobno zdravljenja kroničnega hepatitisa C	15
2.5.2.1	Dejavniki, ki vplivajo na uspešnost zdravljenja	16
2.5.2.2	Načini zdravljenja kroničnega hepatitisa C	17
2.5.2.3	Obvladovanje stranskih učinkov zdravljenja	19
2.6	STATINI IN OKUŽBA Z VIRUSOM HEPATITISA C	20
2.6.1	Zaviralni učinek statinov na pomnoževanje virusa hepatitisa C	21
2.6.2	Steatoza in metabolizem lipidov pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C	23
2.6.3	Varnost uporabe statinov pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C	24
3	PREISKOVANCI IN OPIS METODE	26
3.1	ZASNOVA RAZISKAVE	26
3.2	STATISTIČNA ANALIZA	28
3.3	MNENJE KOMISIJE REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO	29
4	REZULTATI	30
4.1	OSNOVNE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV V PREISKOVANI IN KONTROLNI SKUPINI	30
4.1.1	Osnovne značilnosti bolnikov v preiskovani skupini	32
4.1.2	Osnovne značilnosti bolnikov v kontrolni skupini	38
4.1.3	Razlike v osnovnih značilnostih med preiskovano in kontrolno skupino	42
4.2	VIROLOŠKI ODZIV BOLNIKOV NA ZDRAVLJENJE KRONIČNEGA HEPATITISA C	42
4.2.1	Virološki odziv bolnikov v preiskovani in kontrolni skupini in primerjava med skupinama	42
4.2.2	Dejavniki, ki vplivajo na trajni virološki odziv	48
4.2.3	Ponovitev bolezni pri preiskovani in kontrolni skupini	50

4.3	STRANSKI UČINKI ZDRAVLJENJA PRI BOLNIKI V PREISKOVANI IN KONTROLNI SKUPINI	52
5	RAZPRAVA	55
6	SKLEPI	71
7	POVZETEK	73
7.1	POVZETEK	73
7.2	SUMMARY	75
8	VIRI	77
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lipidogram preiskovancev pred uvedbo zdravljenja kroničnega hepatitisa C glede na genotip virusa hepatitisa C	34
Preglednica 2: Osnovne značilnosti preiskovancev (v deležih) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C	36
Preglednica 3: Osnovne značilnosti preiskovancev (povprečje, mediana, standardni odklon) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C	37
Preglednica 4: Osnovne značilnosti bolnikov v kontrolni skupini (v deležih) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C	40
Preglednica 5: Osnovne značilnosti bolnikov v kontrolni skupini (povprečje, mediana, standardni odklon) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C	41
Preglednica 6: Virološki odzivi pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml)	44
Preglednica 7: Virološki odzivi pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK > 400.000 IU/ml)	45
Preglednica 8: Virološki odzivi pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 3 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml)	46
Preglednica 9: Virološki odzivi pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 3 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK > 400.000 IU/ml)	47
Preglednica 10: Bivariatna analiza dejavnikov, ki vplivajo na trajni virološki odzivi	48
Preglednica 11: Multivariatna analiza dejavnikov, ki vplivajo na trajni virološki odziv	49
Preglednica 12: Ponovitev bolezni pri bolnikih z genotipom 1 v preiskovani in kontrolni skupini glede na izhodiščno plazemsko viremijo	51
Preglednica 13: Ponovitev bolezni pri bolnikih z genotipom 3 v preiskovani in kontrolni skupini glede na izhodiščno plazemsko viremijo	51
Preglednica 14 : Stranski učinki zdravljenja preiskovane in kontrolne skupine	53
Preglednica 15: Hematološki stranski učinki zdravljenja pri preiskovani in kontrolni skupini	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz genoma HCV. Funkcionalno področje genoma kodira poliprotein, ki ga po prevajanju virusne in celične proteaze cepijo na strukturne in nestrukturne beljakovine (Seme in sod., 2011: 101)	5
Slika 2: Naravni potek okužbe z virusom hepatitisa C (Lauer in Walker, 2001: 44)	9
Slika 3: Algoritem mikrobiološkega testiranja ob sumu na okužbo z virusom hepatitisa C (Matičič, 2013: 22-23; Seme in sod., 2011: 104)	11
Slika 4: Vrsta zdravljenja kroničnega hepatitisa C in njegova učinkovitost (Poynard in sod., 2003b: 2097)	14
Slika 5: Sinteza holesterola preko mevalonatne poti v hepatocitu in pomen geranilgeranilpirofosfata pri pomnoževanju virusa hepatitisa C (Ye, 2007: 1018)	22
Slika 6: Prikaz poteka raziskave	31
Slika 7: Preiskovanci razdeljeni v starostne razrede in glede na genotip virusa hepatitisa C	32
Slika 8: Preiskovanci razdeljeni glede na dejavnike tveganja za okužbo z virusom hepatitisa C	33
Slika 9: Razdelitev preiskovancev glede na stadij jetrne fibroze in genotip virusa hepatitisa C	35
Slika 10: Primerjava viroloških odzivov med preiskovano in kontrolno skupino glede na genotip virusa hepatitisa C	43

KAZALO PRILOG

Priloga A: Dovoljenje za objavo članka Selič Kurinčič in sod. (2014) v tiskani in elektronski obliki doktorske disertacije

Priloga B: Objavljen članek Selič Kurinčič in sod. (2014)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALT	alanin transaminaza
AST	aspartat transaminaza
BMI	indeks telesne mase (<i>angl.</i> body mass index)
cEVR	popolni zgodnji virološki odziv (<i>angl.</i> complete early virological response)
CHC	kronični hepatitis C (<i>angl.</i> chronic hepatitis C)
CI	interval zaupanja
CK	kreatinska kinaza
DAA	neposredno proti virusu usmerjene učinkove (<i>angl.</i> direct-acting antivirals)
ETR	virološki odziv ob zaključku zdravljenja (<i>angl.</i> end of treatment response)
EVR	zgodnji virološki odziv (<i>angl.</i> early virological response)
FLU	fluvastatin
GGT	gama-glutamil transferaza
HBV	virus hepatitisa B (<i>angl.</i> hepatitis B virus)
HCC	jetrnocelični rak (<i>angl.</i> hepatocellular carcinoma)
HCV	virus hepatitisa C (<i>angl.</i> hepatitis C virus)
HDL	lipoprotein visoke gostote (<i>angl.</i> high density lipoprotein)
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (<i>angl.</i> human immunodeficiency virus)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A

IFN α	interferon alfa
IL28B	gen za interlevkin 28B
LDL	lipoprotein nizke gostote (<i>angl.</i> low density lipoprotein)
OR	razmerja obetov
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
PEG-IFN α	pegiliran interferon alfa
pEVR	delni zgodnji virološki odziv (<i>angl.</i> partial early virological response)
RBV	ribavirin
RNK	ribonukleinska kislina
RVR	hitri virološki odziv (<i>angl.</i> rapid virological response)
SD	standardni odklon
SOC	standardna kombinacija zdravljenja (<i>angl.</i> standard-of-care treatment)
SVR	trajni virološki odziv (<i>angl.</i> sustained virological response)
VLDL	lipoprotein zelo nizke gostote (<i>angl.</i> very low density lipoprotein)

1 UVOD

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije je z virusom hepatitisa C (HCV) okuženega od 2 do 3 % svetovnega prebivalstva (Lavanchy, 2011). V Sloveniji je pojavnost okužbe ocenjena pod 1 % (Matičič in sod., 2008). V razvitem svetu se HCV najpogosteje prenaša parenteralno z okuženo krvjo med uživalci drog. Bolezen v akutni fazi v 85 % poteka brezsimptomno, naravni potek bolezni pa kar v 75 do 85 % vodi v kronično okužbo. V času poteka raziskave je uveljavljena standardna kombinacija zdravljenja (*angl.* standard-of-care treatment, SOC) kroničnega hepatitisa C (CHC) vključevala pegiliran interferon α (PEG-IFN α) in ribavirin (RBV). Učinkovitost zdravljenja pri bolnikih, okuženih z genotipom HCV 1, se je v številnih raziskavah gibala med 42 in 46 %, pri okuženih z genotipoma HCV 2 in 3 pa med 70 in 93 % (EASL, 2014; Fried in sod., 2002; Hadziyannis in sod., 2004; Manns in sod., 2001). V kolikor pri bolnikih dosežejo trajni virološki odziv (*angl.* sustained virological response, SVR), le-ta v več kot 99 % pomeni ozdravitev, zato je zdravljenje CHC danes eno izmed najučinkovitejših protivirusnih zdravljenj (EASL, 2014; Swain in sod., 2010).

Z raziskavami *in vitro* so dokazali, da HCV za pomnoževanje potrebuje celični geranilgeranil, ki nastaja v hepatocitih pri sintezi holesterola, zato lahko z zaviralci sinteze holesterola (statini) vplivamo na pomnoževanje virusa v hepatocitih (Kapadia in Chisari, 2005; Ye in sod., 2003). Od vseh preiskovanih statinov je imel fluvastatin (FLU) najmočnejšo zaviralno aktivnost na pomnoževanje virusa, *in vitro* so potrdili tudi sinergistični inhibitorni učinek FLU v kombinaciji z interferonom α (IFN α) (Ikeda in sod., 2006).

1.1 NAMEN DELA

Osnovni namen raziskave je bil ugotoviti vpliv dodanega FLU na učinkovitost zdravljenja CHC s standardno kombinacijo PEG-IFN α in RBV. Na temelju objavljenih znanstvenih raziskav *in vitro* o zaviralnem učinku statinov (inhibitorji 3-hidroksil-3-metilglutaril CoA reduktaze) na pomnoževanje HCV smo domnevali, da bomo s kombinacijo FLU, PEG-IFN α in RBV še dodatno zmanjšali ali zaustavili pomnoževanje virusa in tako pripomogli k večji učinkovitosti zdravljenja CHC.

Dodaten namen raziskave je bila presoja varnosti zdravljenja bolnikov s CHC s FLU. Glede na objavljene raziskave in že uveljavljena priporočila smo domnevali, da bo uporaba FLU varna in bodo izsledki naše raziskave okrepili zaupanje v predpisovanje statinov bolnikom s CHC.

Na temelju objavljenih raziskav *in vitro* o vplivu statinov na pomnoževanje HCV smo pri bolnikih s CHC izvedli prospektivno raziskavo, v kateri so preiskovanci poleg SOC dodatno prejeli še FLU. Kontrolno skupino so sestavljali bolniki, ki so bili zdravljeni s SOC PEG-IFN α in RBV v skladu z evropskimi oz. slovenskimi nacionalnimi usmeritvami za zdravljenje CHC v času poteka raziskave. Preiskovano skupino smo primerjali s historično kontrolno skupino; obe skupini sta bili primerljivi po spolu, starosti in genotipu HCV.

1.2 HIPOTEZI

V doktorski disertaciji smo postavili naslednji delovni hipotezi:

- dodatek FLU trenutno uveljavljeni kombinaciji zdravljenja CHC s PEG-IFN α in RBV dodatno zmanjša ali zaustavi pomnoževanje HCV in tako pripomore k večji učinkovitosti zdravljenja CHC,
- uporaba FLU pri bolnikih s CHC je varna.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA C

Okužba s HCV predstavlja pomemben javnozdravstveni problem, saj je po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije s HCV okuženih več kot 184 milijonov ljudi (Mohd Hanafiah in sod., 2013; World Health Organization, 1997). Ocenjujejo, da se vsako leto v svetu na novo okuži med tri do štiri milijone ljudi. Za posledicami kronične okužbe s HCV letno umre 350 000 ljudi (Perz in sod., 2006).

Pojavnost okužbe s HCV se v svetu geografsko zelo razlikuje in je najvišja v osrednji in vzhodni Aziji ter v severnem delu Afrike in na Bližnjem Vzhodu (nad 3,5 %) (Mohd Hanafiah in sod., 2013). V Evropski uniji je s HCV okuženih 7,3 do 8,8 milijonov ljudi, kar predstavlja 1,1 do 1,3 % celotne populacije. V državah osrednje Evrope se pojavnost giba med 0,2 % (Nizozemska) in 1,2 % (Francija), v južno evropskih državah pa je precej višja, in sicer med 2,5 in 3,5 % (Lavanchy, 2011; Esteban in sod., 2008).

V Sloveniji je pojavnost okužbe s HCV ocenjena pod 1 % (Matičič in sod., 2008). Najbolj ogrožena skupina so intravenski uživalci drog, saj je bil delež okuženih s HCV pred uvedbo ustreznih preventivnih ukrepov v začetku 90-ih let kar 50 do 60 % (Klavs in Kustec, 2012; Matičič in Kastelic, 2009; Matičič in sod., 1999). Po sprejetju slovenske nacionalne strategije za obvladovanje okužbe s HCV leta 1997 pa se je delež okuženih v programih zdravljenja opioidne odvisnosti znižal na 21,5 %.

V novem tisočletju ugotavljajo tudi statistično značilno zmanjšanje prisotnosti protiteles anti-HCV pri slovenskih krvodajalcih, saj se je pojavnost anti-HCV pozitivnih testiranih enot krvi zmanjšala iz 0,043 % v obdobju med leti 1991 in 2000 na 0,0067 % v obdobju med 2001 in 2010 (Levičnik Stezinar in Rahne Potokar, 2012).

V razvitih državah je okužba s HCV vzrok za 20 % vseh akutnih hepatitisov, 70 % vseh kroničnih hepatitisov, v 40 % vzrok končne odpovedi jeter, v 60 % vzrok jetrnoceličnega raka (*angl.* hepatocellular carcinoma, HCC) in kar v 30 % vzrok za transplantacijo jeter pri odraslih (Marcellin, 2009).

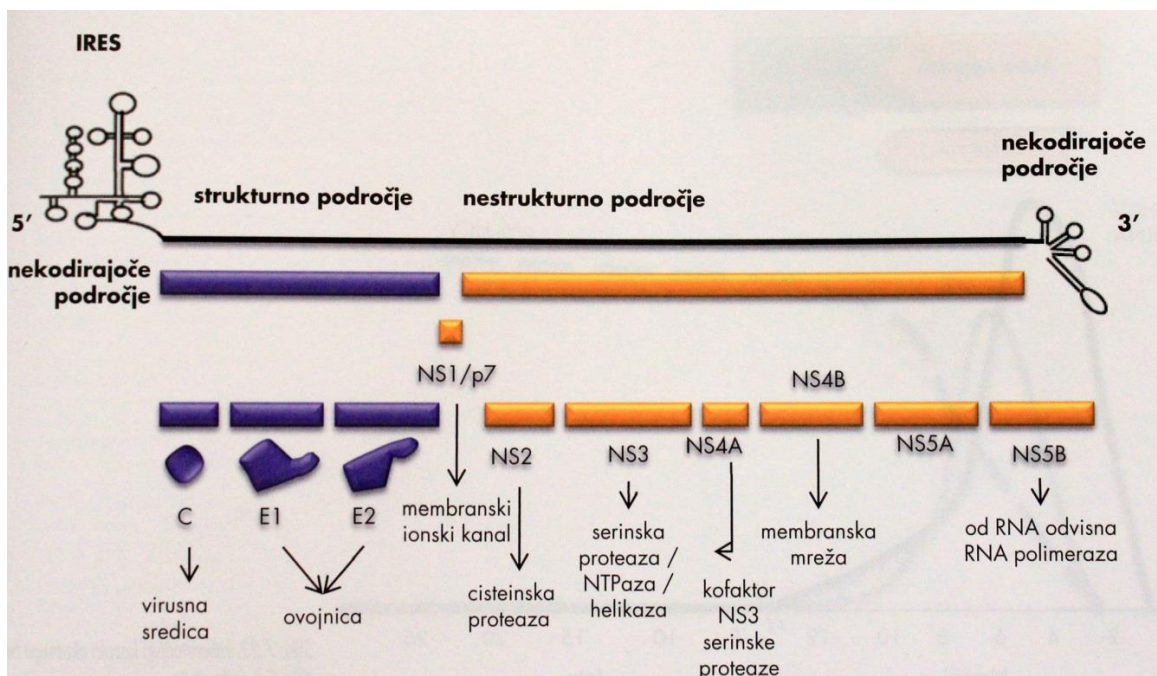
2.2 VIRUS HEPATITISA C

2.2.1 Zgradba virusa hepatitisa C

Genom HCV, predhodno imenovanega virus hepatitisa ne-A ne-B, so leta 1989 odkrili ameriški znanstveniki pod vodstvom Michaela Houghtona (Choo in sod., 1989). Virus hepatitisa C, ki ga uvrščamo v družino *Flaviviridae* in rod *Hepacivirus*, je kroglast virus z ovojnico. Njegov genom je pozitivno polarna enojnovijačna ribonukleinska kislina (RNK) sestavljena iz 9600 nukleotidov. Na obeh koncih genoma so nekodirajoča področja, celotni genom pa kodira en sam večji poliprotein, ki ga po prevajanju virusne in celične proteaze razcepijo na tri strukturne in sedem nestrukturnih beljakovin (slika 1). Strukturna beljakovina C sestavlja del virusne sredice, strukturni beljakovini E1 in E2 pa sta del virusne ovojnice in imata pomembno vlogo pri vstopu virusa v jetrno celico (De Francesco, 1999; Pawlotsky in sod., 2007; Seme in sod., 2011).

Nestrukturna beljakovina p7 tvori membranski ionski kanal, ki je ključen za nastanek kužnih virionov (Sakai in sod., 2003). Beljakovina NS2 je transmembranska beljakovina, ki ima aktivnosti cisteinske autoproteaze in razcepi beljakovini NS2 in NS3 (Schregel in sod., 2006; Suzuki in sod., 2007). Beljakovina NS3 ima aktivnost serinske proteaze in helikaze. Serinska proteaza NS3 igra vlogo pri nadaljnji cepitvi nestrukturnih beljakovin. Beljakovina NS4 predstavlja kofaktor NS3, nastali kompleks NS3/4A ima ključno vlogo pri inaktiviranju kaskade protivirusnih celičnih poti, ki privedejo do aktivacije z interferonom stimuliranih genov (Heim, 2013; Kim in Chang, 2013; Kim in sod., 1996; Suzuki in sod., 2007). Beljakovina NS4B omogoča nastanek membranskega omrežja, kjer neodvisno od endoplazmatskega retikuluma poteka podvojevanje RNK (Egger in sod., 2002). NS5A je metaloprotein, ki igra pomembno vlogo pri virusnem pomnoževanju. Natančen mehanizem delovanja še ni povsem pojasnjen, vendar naj bi se povezoval z lipidnimi rafti in tako omogočil nastanek replikacijskega kompleksa. Poleg tega pa je za nastanek replikacijskega kompleksa pomembno tudi povezovanje NS5A s preniliranimi celičnimi beljakovinami, ki so jih poimenovali FBL2 (Gao in sod., 2004; Pawlotsky in sod., 2007; Ye in sod., 2003; Wang in sod., 2005). Beljakovina NS5B je od RNK odvisna RNK polimeraza, za katero je značilno, da ni sposobna popravljanja, zato nastaja pri

virusnem podvojevanju veliko genetsko zelo podobnih različic, imenovanih *quasispecies* (Martell in sod., 1992; Seme in sod., 2011).



Slika 1: Prikaz genoma virusa hepatitisa C. Funkcionalno področje genoma kodira poliprotein, ki ga po prevajanju virusne in celične proteaze cepijo na strukturne in nestrukturne beljakovine (Seme in sod., 2011: 101).

Figure 1: Hepatitis C virus genom. Translation of genom leads to synthesis of a single polyprotein which undergoes proteolytic processing leading to formation of non-structural and structural proteins (Seme et al., 2011: 101).

Poznamo sedem različnih genotipov HCV, ki se med seboj razlikujejo v 31 do 33 % nukleotidnega zaporedja, in 67 podtipov, ki se razlikujejo v 20 do 25 % nukleotidnega zaporedja (Seme in sod., 2011; Smith in sod., 2014). V Sloveniji prevladuje okužba z genotipom 1 (56 %), sledi mu genotip 3 (37,8 %), redkejša sta genotipa 2 (5 %) in 4 (1,2 %). Do leta 2003 v Sloveniji ni bilo prijavljenih primerov genotipov 5 in 6 (Seme in sod., 2009).

Virus hepatitisa C se v telesu nahaja v različnih oblikah, najbolj kužno obliko predstavljajo virusni delci, ki so vezani na krožeče serumske lipoproteine. Z metodo zunajtelesnega odstranjevanja lipoproteinov nizke gostote (*angl.* low density lipoprotein, LDL) so iz

seruma s HCV okuženih bolnikov odstranili lipoproteine in s tem za 77 % zmanjšali koncentracijo HCV RNK, kar dokazuje, da je večina virusa v serumu vezana na lipoproteine (Andre in sod., 2002; Schettler in sod., 2001).

2.2.2 Življenjski krog virusa hepatitisa C

Virus vstopa v gostiteljeve celice preko z receptorji posredovane endocitoze (Kim in Chang, 2013). Do sedaj so odkrili številne receptorje, ki sodelujejo pri tem procesu. Med njimi so najpomembnejši CD81 (tetraspanin), SRB1 (*angl.* scavenger receptor class B type 1), ki je glavni receptor za vstop lipoproteina visoke gostote (*angl.* high density lipoprotein, HDL) v hepatocit kot tudi beljakovini tesnih stikov klavdin-1 in okcludin ter receptor za LDL holesterol (Evans in sod., 2007; Farquhar in sod., 2012; Kim in Chang, 2013; Molina in sod., 2007; Pileri in sod., 1998; Scarselli in sod., 2002). Virus hepatitisa C sprva vstopi v hepatocit preko beljakovine virusne ovojnice E2, ki se veže na receptorje celične membrane CD81 in SRB1 (Farquhar in sod., 2012; Pileri in sod., 1998; Scarselli in sod., 2002). Pomembno vlogo koreceptorja pri nadaljnjem vstopu predstavljata beljakovini klavdin-1 in okcludin (Evans in sod., 2007). Nedavno so odkrili, da pri vstopu HCV v celico sodelujejo tudi receptorji tirozinske kinaze in NPC1L1 (*angl.* Niemann-Pick C1 like 1 cholesterol uptake receptor), ki se nahaja na površju hepatocitov in ga lahko zavre učinkovina ezetimib, registrirana za zdravljenje hiperholesterolemije (Kim in Chang, 2013; Sainz in sod., 2012). Virus hepatitisa C, ki je vezan na serumske lipoproteine, pa vstopi v hepatocite preko vezave apolipoproteina B na receptor za LDL holesterol (Bartenschlager in sod., 2010; Bassendine in sod., 2011; Zeisel in sod., 2011).

Ob vstopu virusa v celico pride do znižanja pH v notranjosti endolizosoma, ob tem nastanejo konformacijske spremembe beljakovin virusne ovojnice, kar omogoča zlitje virusne ovojnice z membrano endolizosoma ter sproščanje nukleokapside v citoplazmo (Helle in Dubuisson, 2008; Kim in Chang, 2013).

Po vstopu virusa v citoplazmo hepatocita nastopi odstranjevanje virusne kapside in začetek prevajanja virusne RNK, ki poteka od notranjega mesta IRES (*angl.* internal ribosomal

entry side). Nastali poliprotein se ko- in po-translacijsko cepi z gostiteljevimi signalnimi peptidazami in dvema virusnima proteazama (NS2 in NS3/4A) v strukturne in nestrukturne proteine. Nastali virusni proteini ostanejo tesno povezani z znotrajceličnimi membranami in skupaj tvorijo replikacijski kompleks, ki omogoča podvojevanje virusnega genoma. Beljakovina NS5B omogoča sintezo genomu komplementarne negativno usmerjene RNK, preko katere pride do sinteze končne, pozitivno usmerjene RNK. Nastala pozitivno usmerjena RNK se združi z beljakovinami virusne sredice v nukleokapsido. Sestavljanje in izstopanje novonastalih virusov iz hepatocitov ostaja še vedno slabo poznano (Kim in Chang, 2013; Seme in sod., 2011; Suzuki in sod., 2007). Raziskave kažejo, da je sproščanje virionov v tesni povezavi z metabolizmom lipidov, predvsem lipoproteini zelo nizke gostote (*angl.* very low density lipoprotein, VLDL), saj so z zaviralci sproščanja VLDL holesterola iz celične linije Huh7 sočasno zavrli tudi sproščanje HCV (Gastaminza in sod., 2008; Huang in sod., 2007).

2.3 OKUŽBA Z VIRUSOM HEPATITISA C

2.3.1 Načini okužbe

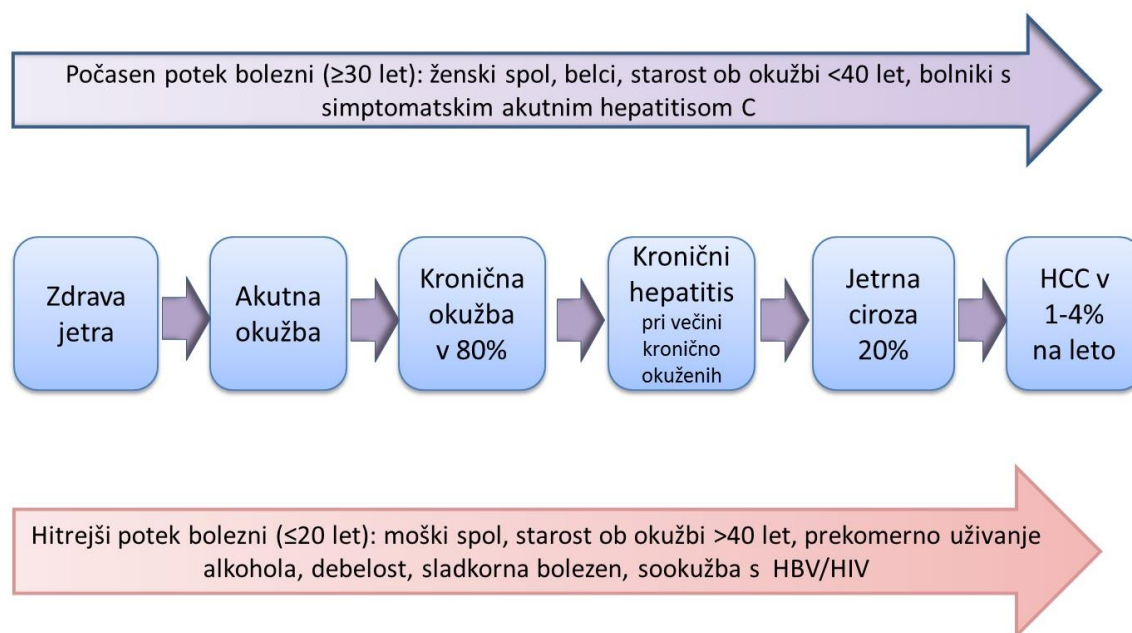
Najpogostejši način prenosa HCV je parenteralni z okuženo krvjo med intravenskimi uživalci drog in je vzrok za več kot 40 % vseh okuženih v razvitem svetu. Dejavnike tovrstnega tveganja predstavljajo tudi njuhanje drog, neprofesionalno tetoviranje, akupunktura, prebadanje kože in sluznic. Prenos HCV med transfuzijo krvi in krvnih pripravkov ter hemodializo v razvitem svetu postaja izrazita redkost zaradi uvedbe presejalnih testov in splošnih previdnostnih ukrepov (Lauer in Walker, 2001; Lavanchy, 2011). Po uvedbi rutinskega testiranja krvi je tveganje za prenos HCV med transfuzijo krvi in krvnih derivatov v razvitem svetu ocenjeno na 0,001 do 0,01 %. V Sloveniji so leta 1993 uvedli serološko testiranje krvodajalcev na HCV okužbo, leta 2000 so testiranje nadgradili z molekularnimi metodami dokazovanja HCV RNK (Levičnik Stezinar in Rahne Potokar, 2012). Okužbi so izpostavljeni tudi zdravstveni delavci ob incidentu na delovnem mestu. Med izpostavljenimi zdravstvenimi delavci je prišlo do prenosa okužbe s HCV po enkratnem vbodu z okuženo iglo pri 0,4 do 0,5 % (Matičič in Kmet Lunaček, 2009).

Zelo redko pride do prenosa HCV med spolnim odnosom. V stalnih partnerskih zvezah je bila pojavnost okužbe s HCV pri spolnih partnerjih okuženih med 0 in 2,7 %. Najnovejše raziskave pa so pokazale, da je najvišja letna incidenca prenosa HCV s spolnimi odnosi 0,07 % (Petruff Cheney in sod., 2000; Terrault in sod., 2013). Redko pride tudi do vertikalnega prenosa okužbe z matere na otroka, ob tem je ocenjeno tveganje za prenos 5 do 6 % (Esteban in sod., 2008; Petruff Cheney in sod., 2000; Chen in Morgan, 2006). Kljub natančno raziskavnim okoliščinam o možnih načinih prenosa ostane pri 10 do 30 % bolnikov način okužbe nepojasnen.

2.3.2 Naravni potek okužbe z virusom hepatitisa C

Okužbo s HCV redko prepoznamo v akutni fazi, saj le-ta pri večini bolnikov poteka brezsimptomno ali pa imajo bolniki le blage težave (slika 2). Klinična slika akutnega hepatitisa C se v povprečju razvije v sedmih do osmih tednih po izpostavitvi HCV, inkubacijska doba pa je lahko dolga celo do 26 tednov. Pri 20 do 30 % okuženih se pojavijo klinični simptomi, ki so največkrat nespecifični (utrujenost, bolečine v trebuhu, slabost), lahko pa se pojavi zlatenica in tipno povečana jetra. Okuženi imajo zvišane ravni aminotransferaz, predvsem alanin transaminaze (ALT), kar je odraz poškodbe hepatocitov. Do fulminante jetrne odpovedi pride pri manj kot 1 % bolnikov z akutnim hepatitisom C (Lauer in Walker, 2001; Chen in Morgan, 2006; Santantonio in sod., 2008).

Do spontane odstranitve HCV pride pri 15 do 25 % bolnikov in je pogostejša pri ženskah, mladih (starost ob okužbi pod 25 let), simptomatskih bolnikih in belcih. Pri 75 do 85 % okuženih akutna okužba preide v kronično, ki jo opredeljuje vsaj šest mesečna prisotnost HCV RNK v krvi (Chen in Morgan, 2006; Santantonio in sod., 2008; Hoofnagle, 2002).



HCC: jetrnocelični rak (*angl.* hepatocellular carcinoma)

Slika 2: Naravni potek okužbe z virusom hepatitisa C (Lauer in Walker, 2001: 44).

Figure 2: The natural history of hepatitis C virus infection (Lauer and Walker, 2001: 44).

Večina kroničnih okužb preide v kronični hepatitis, ki ima značilno patohistološko sliko in se kaže z mononuklearno celično infiltracijo jetrnega parenhima in portalnih polj, fokalno nekrozo hepatocitov in različno stopnjo fibroze. Poškodba jetrnega tkiva je predvsem posledica imunskega odgovora organizma na okužbo (Hoofnagle, 2002). Pri 20 % bolnikov bolezen v 20 letih napreduje do jetrne ciroze, vendar je progres bolezni lahko zelo različen. Poznanih je več dejavnikov, ki napovedujejo hitrejše napredovanje jetrne bolezni: starost ob okužbi nad 40 let, moški spol, sočasna okužba z virusom hepatitisa B (*angl.* hepatitis B virus, HBV) ali virusom človeške imunske pomanjkljivosti (*angl.* human immunodeficiency virus, HIV), uživanje alkohola (nad 30 g/dan pri moških in nad 20 g/dan pri ženskah), sočasna prisotnosti nekaterih drugih bolezni (hemokromatoza, steatohepatitis, shistosomoza, odpornost na inzulin), oslavljen imunski odziv bolnika in stadij jetrne fibroze pri odkritju bolezni (Chen in Morgan, 2006; Lauer in Walker, 2001; Poynard in sod., 1997).

Napredovanje jetrne bolezni je navadno dolgo klinično nezaznavno in se lahko razkrije šele, ko nastopi jetrna dekompenzacija (zlatenica, ascites, krvavitve iz varic, hepatorenalni sindrom, jetrna encefalopatija). Pričakovano desetletno preživetje je pri bolnikih s kompenzirano jetrno cirozo 79 %. V kolikor se pojavi jetrna dekompenzacija, je pričakovano petletno preživetje 50 % (Fattovich in sod., 1997). Pri bolniki z razvito jetrno cirozo obstaja tveganje za pojav HCC v 1 do 4 % letno (Cheney in sod., 2000; Lauer in Walker, 2001).

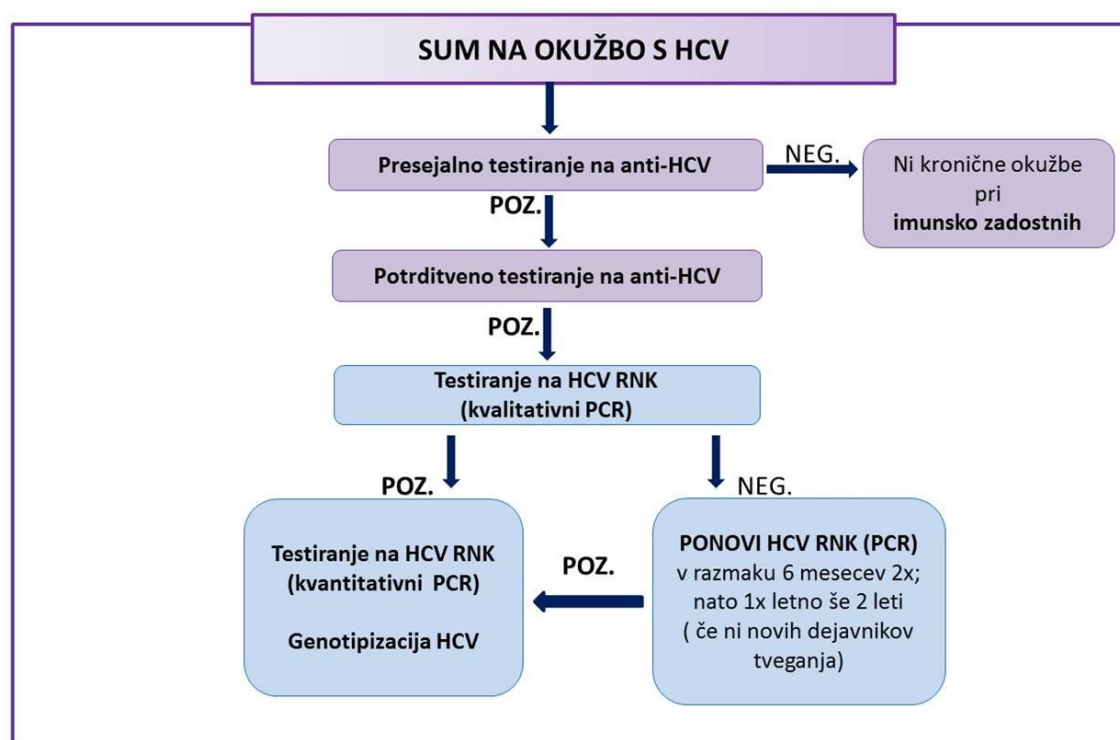
Kronični hepatitis C je povezan tudi s številnimi zunajjetrnimi obolenji, ki so najverjetneje imunsko pogojena. Med njimi so najpogostejše mešana krioglobulinemija, membranoproliferativni glomerulonefritisi, Sjögrenov sindrom, avtoimunski hepatitis, avtoimunski tiroiditis, idiopatska pljučna fibroza, lichen planus in pozna kožna porfirija. Opazili so tudi povečano pojavnost ne-Hodgkinovega limfoma (Blackard in sod., 2006; Zignego in sod., 2007). Cacoub in sod. (1999) so objavili izsledke obsežne prospektivne raziskave, kjer je 74 % bolnikov navajalo vsaj eno zunanjetrno manifestacije v sklopu prebolevanja okužbe s HCV. Najpogosteje (pojavnost nad 10 %) so se pojavljale bolečine v sklepih in mišicah, parestezije, srbečica kože in sindrom suhih oči in ust. V primeru ozdravitve CHC so bolniki v večini primerov navajali tudi izboljšanje zunajjetrnih obolenj (Blackard in sod., 2006)

2.4 DIAGNOSTIKA OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA C

2.4.1 Mikrobiološke preiskave

Mikrobiološka diagnostika CHC temelji na posrednih seroloških preiskavah, s katerimi dokazujemo protiteles anti-HCV (slika 3). V ta namen uporabljajo presejalni encimsko imunski test tretje ali četrte generacije (Seme in sod., 2011; Ghany in sod., 2009). Po okužbi se pri bolnikih v povprečju po sedmih do dvanajstih tednih pojavijo v serumu protitelesa anti-HCV, ki pa ne zagotavljajo imunosti pred ponovno okužbo. V primeru prisotnosti anti-HCV protiteles je potrebno z neposrednimi diagnostičnimi metodami, ki temeljijo na dokazu prisotnosti HCV RNK z molekularno metodo (*angl.* polymerase chain

reaction, PCR), dokazati ali gre za aktivno okužbo ali stanje po preboleli okužbi (Seme in sod., 2011; Ghany in sod., 2009, Scott in Gretch, 2007). Prisotnost HCV RNK v dveh neodvisnih vzorcih, odvzetih z vsaj šest mesečnim zamikom, potrjuje kronično okužbo s HCV. V kolikor ima bolnik prisotna anti-HCV protitelesa in ob tem znotraj enega leta dvakrat negativen PCR na HCV RNK, je bolnik z veliko verjetnostjo prebolel okužbo s HCV. Pri imunsko oslabljenih bolnikih (okužba s HIV, hemodializa, stanje po transplantaciji solidnih organov, hipo- in a-gamaglobulinemija) so lahko serološke preiskave proti HCV lažno negativne, zato je za izključevanje okužbe pri teh bolnikih potrebno opraviti molekularne preiskave.



ALT: alanin transaminaza; HCV: virus hepatitisa C; PCR: verižna reakcija s polimerazo; RNK: ribonukleinska kislina

Slika 3: Algoritem mikrobiološkega testiranja ob sumu na okužbo z virusom hepatitisa C (Matičič, 2013: 22-23; Seme in sod., 2011: 104).

Figure 3: An algorithm for microbiological testing of hepatitis C virus infection (Matičič, 2008: 22-23; Seme et al, 2011: 104).

Pri vsakdanjem kliničnem delu so na voljo kvantitativne in kvalitativne različice PCR, slednje so občutljivejše od večine dostopnih kvantitativnih testov in zaznajo HCV RNK že pri koncentraciji 5-15 IU/ml. S kvantitativno metodo določamo virusno breme (HCV RNK v IU/ml) pri bolnikih s CHC pred uvedbo zdravljenja in sledimo virološkem odzivu med zdravljenjem in po njem (Seme in sod., 2011; Scott in Gretch, 2007).

Pred uvedbo zdravljenja je izredno pomembna tudi genotipizacija HCV, saj genotip HCV vpliva na odmerjanje RBV in trajanje zdravljenja, hkrati pa napoveduje tudi uspešnost zdravljenja. Za določevanje genotipa HCV najpogosteje uporabljajo metodo reverzne hibridizacije (Ghany in sod., 2009; Seme in sod., 2011)

2.4.2 Patohistološka diagnostika

Pri bolnikih s CHC so ravni aminotranferaz v krvi oscilirajoče, lahko celo povsem normalne in ne odražajo poškodb jetrnega tkiva. To je eden od razlogov, da patohistološki pregled jetrnega tkiva ostaja zlati standard za določevanje vnetne aktivnosti in napredovanja fibroznih sprememb v jetrih. Poleg tega je jetrna biopsija pomembna tudi za izključevanje ostalih vzrokov jetrne bolezni (Ghany in sod., 2009; Lauer in Walker, 2001). V Sloveniji v zadnji letih za histološko opredelitev sprememb v jetrih pri virusnih hepatitisih uporabljamo lestvico METAVIR, s katero točkovno opišemo stopnjo aktivnosti vnetja in nekroz (gradus od 0 do 18) ter obliko fibroze jetrnega tkiva do razvoja ciroze (stadij od 0 do 4) (Bedossa in Poynard, 1996).

Jetrna biopsija je kontraindicirana pri naslednjih stanjih: huda koagulopatija, biliarna obstrukcija, nesodelujoč bolnik in kožno vnetje v področju izvedbe jetrne biopsije (EASL, 2014; Ghany in sod., 2009; Rockey in sod., 2009). V primeru prisotnosti hemangiomov v jetrih je mogoče opraviti le ultrazvočno-vodeno biopsijo. Ker pa je jetrna biopsija invazivna metoda, z incidenco hujših zapletov pri enem od 4000 do 10.000 posegov, se v zadnjem času uveljavljajo različne posredne metode za oceno prizadetosti jetrnega tkiva (Castera in sod., 2010; Degos in sod., 2010).

2.5 ZDRAVLJENJE KRONIČNEGA HEPATITISA C

2.5.1 Zgodovina zdravljenja kroničnega hepatitisa C

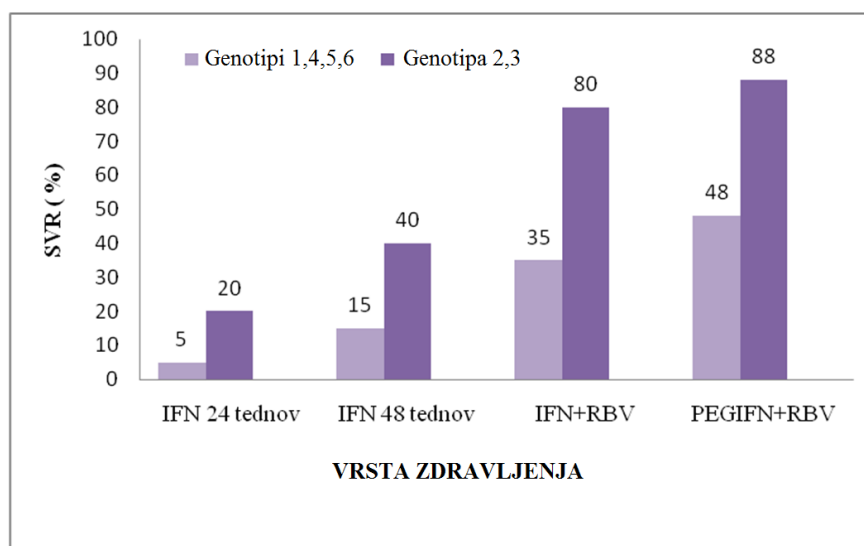
Zdravljenje akutnega in kroničnega hepatitisa C je trenutno eno izmed najučinkovitejših zdravljenj virusnih okužb. Z njim želimo doseči normalizacijo serumskih aminotransferaz, odstranitev virusa iz organizma ter izboljšati patohistološke spremembe v jetrih (EASL, 2014; Ghany in sod., 2009)

Prvo zdravilo, ki so ga leta 1986 uvedli za zdravljenje bolnikov s kroničnim hepatitisom ne-A ne-B, je bil IFN α in je več kot deset let veljal za terapijo izbora (slika 4) (Hoofnagle in sod., 1986; Moussalli in sod., 1998). Interferon α deluje v telesu imunomodulatorno, saj se veže na z interferonom stimulirane gene in s tem sproži kaskado protivirusnih celičnih poti (Heim, 2013; Moussalli in sod., 1998). Pomembna pomanjkljivost prvotne oblike IFN α je bila predvsem premajhna učinkovitost zdravljenja ter parenteralna oblika s pogostim dajanjem zdravila, ki je zaradi kratke razpolovne dobe zahtevala podkožno dajanje injekcij trikrat tedensko. Poleg tega so bolniki imeli številni stranske učinke zdravljenja. Učinkovitost zdravljenja so spremljali z ravno serumske ALT in določanjem plazemske viremije. Ugotovili so, da je 38 % bolnikov doseglo trajen biokemični odgovor, vendar so bile ponovitve bolezni pogoste, tako da je le 15 do 20 % bolnikov doseglo trajen virološki odziv na zdravljenje (Hoofnagle in sod., 1986; Lau in sod., 1998; Reichard in sod., 1998).

Leta 1998 so bolnike pričeli zdraviti s kombinacijo IFN α in RBV. Ribavirin je sintetični analog gvanozina, ki zavira sintezo virusne RNK. S tremi različnimi mehanizmi deluje v celici protivirusno, tako da z inhibicijo inozin-monofosfat dehidrogenaze zmanjša znotrajcelično količino gvanozin trifosfata, vpliva na sintezo virusne informacijske RNK in neposredno zavira virusno RNK polimerazo (Moussalli in sod., 1998; Reddy in sod., 2009). S kombinacijo standardnega IFN α in RBV so pri bolnikih dosegli trajno uspešnost zdravljenja (normalizacija ALT in odsotnost HCV RNK) pri 36 do 43 % bolnikov (McHutchison in sod., 1998; Moussalli in sod., 1998; Poynard in sod., 1998; Reichard in sod., 1998).

Leta 2000 so pričeli bolnike zdraviti s izboljšano različico IFN α , na katerega so kovalentno vezali polietilen glikol in dobili t. i. pegiliran interferon α (PEG-IFN α). S to kemijsko modifikacijo so dosegli pri PEG-IFN α daljši razpolovni čas, zato si bolniki injekcijo dajejo podkožno le enkrat tedensko (Zeuzem in sod., 2000). Kombinacija PEG-IFN α in RBV je še vedno del sodobnega zdravljenja CHC. Zdravljenje s kombinacijo PEG-IFN α in RBV pri bolnikih, okuženih z genotipom 1, je uspešno v 42 do 52 %, pri okužbi z genotipoma 2 in 3 pa v 73 do 82 % (EASL, 2014; Fried in sod., 2002; Hadziyannis in sod., 2004; Manns in sod., 2001).

Za vse oblike zdravljenja z IFN α (z RBV ali brez njega) pa je značilno, da med zdravljenjem pri večini bolnikov pride do izboljšanja patohistoloških sprememb v jetrnem tkivu ne glede na to, ali je bil dosežen SVR (Pockros in sod., 2012; Poynard in sod., 2002). Do izboljšanja vnetnih sprememb in nekroz je prišlo pri 39 do 73 % bolnikov, kar pri 49 % bolnikov pa so se zmanjšale fibrozne spremembe za vsaj eno točko po lestvici METAVIR (Poynard in sod., 2002).



IFN: interferon α ; PEG IFN: pegiliran interferon α ; RBV: ribavirin; SVR: trajni virološki odziv

Slika 4: Vrsta zdravljenje kroničnega hepatitisa C in njegova učinkovitost (Poynard in sod., 2003b: 2097).

Figure 4: Type of chronic hepatitis C treatment and its efficacy (Poynard et al., 2003b: 2097).

Izkušnje zdravljenja CHC v Sloveniji segajo v leto 1992, ko so sprva zdravili bolnike z monoterapijo IFN α , vendar zdravljenje ni bilo uspešno, saj so vsi bolniki po zaključku zdravljenja imeli prisotno plazemsko viremijo (Lešničar in sod., 1995). Prva multicentrična nacionalna raziskava v Sloveniji je potekala od leta 1997 do 1998. Bolniki so prejeli IFN α skupno 18 mesecev. Zdravljenje je bilo definirano kot uspešno, če bolnik tri mesece po zaključku zdravljenja ni imel prisotne plazemske viremije. Uspešnost zdravljenja so ugotavljali pri skupno 28 % vseh bolnikov, od tega zgolj pri 10 % bolnikov z genotipom 1 in kar pri 86 % bolnikov z genotipom 3 (Brinovec in sod., 2002). Naslednja multicentrična raziskava zdravljenja s kombinacijo IFN α in RBV je potekala v letih 1999 in 2000; SVR je doseglo kar 43 % bolnikov (Brinovec in sod., 2004).

Tretja nacionalna multicentrična raziskava je potekala v letih 2002 do 2004, v kateri so ugotavljali učinkovitost kombinacije PEG-IFN α in RBV, ki je bila uspešna v 61 % (Matičič in sod., 2004).

2.5.2 Sodobno zdravljenje kroničnega hepatitisa C

Sodobne evropske smernice za zdravljenje CHC iz leta 2011 priporočajo kombinacijo PEG-IFN α in RBV (EASL, 2014). Poglavitni cilj zdravljenja je SVR, ki v več kot 99 % predstavlja trajno ozdravitev (Giannini in sod., 2010; EASL, 2014; Swain in sod., 2010). Trajni virološki odziv je definiran kot odsotnost HCV RNK v bolnikovem serumu 24 tednov po končanem zdravljenju, določenim s testom, ki ima spodnjo mejo občutljivost HCV RNK 50 IU/ml ali manj (EASL, 2014).

Med zdravljenjem pri bolniku določamo naslednje virološke kazalce (EASL, 2014):

1. hitri virološki odziv (*angl.* rapid virological response, RVR), ki pomeni odsotnost HCV RNK v krvi štiri tedne po pričetku zdravljenja,
2. zgodnji virološki odziv (*angl.* early virological response, EVR), pri katerem poznamo dve različici. Popolni zgodnji virološki odziv (*angl.* complete early virological response, cEVR) pomeni odsotnost HCV RNK po 12 tednih zdravljenja, delni EVR (*angl.* partial

early virological response, pEVR) predstavlja znižanje virusnega bremena za najmanj dva logaritma po 12 tednih zdravljenja,

3. virološki odziv ob zaključku zdravljenja (*angl.* end of treatment response, ETR) je definiran kot odsotnost HCV RNK ob zaključku zdravljenja.

2.5.2.1 Dejavniki, ki vplivajo na uspešnost zdravljenja

Na uspešnost zdravljenja vplivajo številni dejavniki tako s strani gostitelja kot virusa.

Med najpomembnejšimi gostiteljevimi dejavniki so: spol, starost, stadij jetrne fibroze, indeks telesne mase (*angl.* body mass index, BMI), sočasna okužba s HBV in HIV in polimorfizmem gena za interleukin 28B (IL28B). Večjo verjetnost za ozdravitev imajo ženske, bolniki z nenapredovalimi spremembami jetrnega tkiva, s starostjo pod 40 let, BMI pod 30 kg/m² in z različico IL28B CC (Bressler in sod., 2003; Darling in Fried, 2006; EASL, 2014; Ge in sod., 2009; Shi in sod., 2012).

Na uspešnost zdravljenja pomembno vpliva tudi predanost zdravljenju. Ugotovili so, da imajo bolniki, ki prejema vsaj 80 % odmerka PEG-IFN α in RBV vsaj 80 % predvidenega trajanja zdravljenja, večjo verjetnost za ozdravitev. Raziskave so pokazale, da se je pri bolnikih z genotipom 1 in tako predanostjo zdravljenju SVR zvišal z 61 % na 72 % (McHutchison in sod., 2002).

Virusni dejavniki, ki vplivajo na uspešnost zdravljenja so: genotip HCV (ugodnejša genotipa 2 in 3), nizka izhodiščna plazemska viremija (pod 400.000 do 800.000 IU/ml) in virološki odziv v četrtem tednu zdravljenja (EASL, 2014). Hiter virološki odziv je močan napovedovalec uspešnosti zdravljenja s pozitivno napovedno vrednost več kot 89 %. V kolikor pa bolnik ne doseže EVR, je velika verjetnost (negativna napovedna vrednost 97 do 100 %), da zdravljenje ne bo uspešno (Davis in sod., 2003; Ferenci in sod., 2005; Mihm in sod., 2006; Poordad in sod., 2008). Najnovejše raziskave kažejo, da imata izguba plazemske viremije po dveh (*angl.* very rapid virological response, vRVR) in štirih tednih zdravljenja (RVR) najmočnejšo napovedno vrednost, da bolnik doseže SVR (EASL, 2014;

Fried in sod., 2008; Marcellin in sod., 2012).

2.5.2.2 Načini zdravljenja kroničnega hepatitisa C

Za zdravljenje CHC se odločimo pri vseh bolnikih, ki so starejši od 18 let, imajo prisotno plazemsko viremijo HCV RNK, vsaj stadij 2 jetrne fibroze po lestvici METAVIR in so brez kontraindikacij za uvedbo zdravljenja ter izpolnjujejo določene dodatne vključitvene pogoje pred uvedbo zdravljenja (npr. mnenje lečečega zdravnika iz Centra za preprečevanje in zdravljenje odvisnih od prepovedanih drog) in se strinjajo z zdravljenjem (EASL, 2014; Maticič in Kastelic, 2009)

Absolutne kontraindikacije za uvedbo zdravljenja trenutno predstavljajo: nevodljiva depresija, psihoza ali epilepsija, nevodljiva avtoimunska bolezen, hude sočasne bolezni kot so težko vodljiva arterijska hipertenzija, sladkorna bolezen in kronična obstruktivna pljučna bolezen. Absolutno kontraindikacijo pa predstavljata tudi nosečnost in nezmožnost zagotovitve ustrezne kontracepcije (EASL, 2014; Ghany in sod., 2009; Reddy in sod., 2009).

Relativne kontraindikacije za uvedbo zdravljenja pa trenutno predstavljajo nenormalnosti v izhodiščni krvni sliki (hemoglobin manj kot 130 g/dl za moške in 120 g/dl za ženske; število nevtrofilcev pod $1.500/\text{mm}^3$, število trombocitov pod $90.000/\text{mm}^3$), ledvična bolezen z ravnjo kreatinina nad $132\ \mu\text{mol/l}$, nezdravljena bolezen ščitnice in pomembna koronarna bolezen (EASL, 2014).

Na odločitev o pričetku zdravljenja vplivajo številni dejavniki. Med najpomembnejšimi je podatek o napredovali jetrni bolezni, zato je pred uvedbo zdravljenja ključnega pomena patohistološki pregled jetrnega tkiva. Pri bolnikih, ki imajo že napredovalo jetrno bolezen (stadij 3 fibroze po lestvici METAVIR), bo kronični hepatitis C hitreje napredoval v jetrno cirozo kot pri bolnikih z minimalnimi spremembami jetrnega tkiva (stadij 0 do 2 po lestvici METAVIR) (EASL, 2014; Ghany in sod., 2009; Poynard in sod., 1997). Ostali dejavniki, ki vplivajo na začetek uvedbe zdravljenja so: sočasna okužba s HBV in HIV, sočasna jetrna okvara zaradi drugih hepatotoksičnih dejavnikov in pridružene bolezni jeter. Pri

bolnikih z minimalnimi patohistološkimi spremembami jetrnega tkiva je odločitev o pričetku zdravljenja individualna.

Zdravljenje CHC poteka s kombinacijo PEG-IFN α -2a (180 μ g) ali PEG-IFN α -2b (1,5 μ g/kg telesne teže) enkrat tedensko v obliki podkožnih injekcij in peroralnim prejemanjem RBV dvakrat dnevno. Vsi bolniki, okuženi z genotipoma 1 in 4, ter bolniki, okuženi z genotipoma 2 in 3, ki imajo negativne napovedne kazalce pred uvedbo zdravljenja (BMI nad 25 kg/m², odpornost na inzulin, metabolični sindrom, napredovalo jetrno obolenje, starejši bolniki), po najnovejših priporočilih prejemajo RBV v odmerku 15 mg/kg telesne teže dnevno. Bolniki, okuženi z genotipoma 2 in 3, ki nimajo negativnih napovednih kazalcev za SVR, prejemajo RBV v odmerku 800 mg dnevno (EASL, 2014; Ghany in sod., 2009).

Na trajanje zdravljenja vplivata genotip HCV, s katerim je bolnik okužen, in virološki odziv med zdravljenjem. Naivne (predhodno nezdravljene) bolnike, okužene z genotipom 1, zdravimo v primeru nizke izhodiščne plazemske viremije in RVR le 24 tednov, sicer pa traja zdravljenje 48 tednov. V primeru počasnega virološkega odziva (*angl.* delayed virological response, DVR) se zdravljenje podaljša na 72 tednov. Bolnike, okužene z genotipoma 2 in 3, zdravimo skupno 24 tednov, ne glede na virološki odziv med zdravljenjem (EASL, 2014).

V obsežnih kliničnih raziskavah, namenjenih registraciji zdravil, je bilo zdravljenje s kombinacijo PEG-IFN α in RBV pri bolnikih, okuženih z genotipom 1, uspešno v 42 do 52 %, pri okužbi z genotipoma 2 in 3 pa v 73 do 82 % (Fried in sod., 2002; Hadziyannis in sod., 2004; Manns in sod., 2001).

V zadnjih letih poteka zelo hiter razvoj novih učinkovin za zdravljenje CHC iz skupine neposredno proti virusu usmerjenih učinkovin (*angl.* direct-acting antivirals, DAA). V letu 2011 sta bila za zdravljenje CHC genotipa 1 registrirana boceprevir in telaprevir, ki sta zaviralca serinske proteaze NS3/4A (Ghany in sod., 2011). V Sloveniji imamo zdravili na voljo od jeseni 2012. Klinične raziskave so pokazale, da kombinacija PEG-IFN α , RBV in enega od zaviralcev proteaze izboljša SVR tako pri naivnih kot predhodno že zdravljenih bolnikih. Z navedeno trotirno kombinacijo so uspeli ozdraviti 67 do 75 % naivnih

bolnikov, 69 do 75 % bolnikov, ki so ob predhodnem dvotirnem zdravljenju imeli ponovitev bolezni, 59 % delnih odzivnikov in 38 do 52 % popolno neodzivnih na predhodno dvotirno zdravljenje (Bacon in sod., 2011; Jacobson in sod., 2011; McHutchison in sod., 2010; Poordard in sod., 2011).

2.5.2.3 Obvladovanje stranskih učinkov zdravljenja

Zdravljenje s SOC lahko povzroči številne stranske učinke. Med najpogostejšimi so gripi podobni simptomi kot so: vročinsko stanje, glavobol, bolečine v mišicah in bolečine v sklepih. Med težavami prebavnega trakta so najpogosteje pojavljajo slabost, izguba teka, izguba telesne teže in driska. Pogoste so tudi kožne spremembe na mestu vboda podkožne injekcije, dermatitis ter izpadanje las (Manns in sod., 2006).

Bolniki navajajo tudi psihične težave kot so utrujenost, razdražljivost, anksioznost, nespečnost, depresija in kognitivne motnje. Izredno redko v času zdravljenja CHC nastopita psihoza in samomorilnost. Obvladovanje tovrstnih stranskih učinkov poleg psihosocialne in psihiatrične podpore vključuje tudi farmakološko zdravljenje (Manns in sod., 2006; Schaefer in sod., 2012, Matičič in Kastelic, 2009).

Pomembni stranski učinki zdravljenjem CHC so spremembe v krvni slik, ki so lahko tudi življenje ogrožajoče. Ribavirin povzroči ekstravaskularno hemolitično anemijo (do 36 %), katere hujša stopnja (padec hemoglobina pod 100 g/l) se pojavi pri 20 % bolnikov. Ukrepi za obvladovanje anemije hujše stopnje so poleg zniževanje dnevnega odmerka RBV tudi uvedba eritropoetina (Mac Nicholas in Norris, 2010; Thévenot in sod., 2007).

Pegiliran interferon α zavira kostni mozeg, kar privede do pojava anemije, nevtropenije in trombocitopenije. Levkopenija (levkociti pod $4.000/\text{mm}^3$) različnih stopenj se razvije pri 30 do 50 % bolnikov. Hujša stopnja nevtropenije (nevtofilci pod $750/\text{mm}^3$) se pojavi redko, v tem primeru je na mestu uporaba stimulirajočih faktorjev granulocitnih kolonij (EASL, 2014; Thévenot in sod., 2007; Mac Nicholas in sod., 2010). Za kritično trombocitopenijo nekateri avtorji svetujejo uporabo agonistov receptorjev trombopoetina, vendar do sedaj v Sloveniji pri bolniki s CHC še nimamo izkušenj na področju uporabe

faktojev stimulacije trombocitov (EASL, 2014).

Zaradi imunomodulatornega učinka IFN lahko zdravljenje s PEG IFN α privede do poslabšanja avtoimunih obolenj kot sta sladkorna bolezen in avtoimunski hepatitis. Najpogosteje pa se pojavi avtoimunski tiroiditis (Manns in sod., 2006).

Pomemben neželen učinek RBV je njegova teratogenost, zato je zdravljenje z njim kontraindicirano v nosečnosti ali pri nezmožnosti zagotoviti ustrezno kontracepcijo (EASL, 2014; Reddy in sod., 2009)

Zaradi številnih stranskih učinkov, ki se pojavljajo med zdravljenjem, je ključno redno spremljanje bolnikov s strani specialista za virusne hepatitis in po potrebi tudi multidisciplinarna obravnava (psihiater, dermatolog, ipd.). Bolniki imajo prva dva meseca zdravljenja redne kontrolne preglede na 14 dni, nato enkrat mesečno oz. pogosteje v primeru resnih stranskih učinkov (Matičič in Kastelic, 2009).

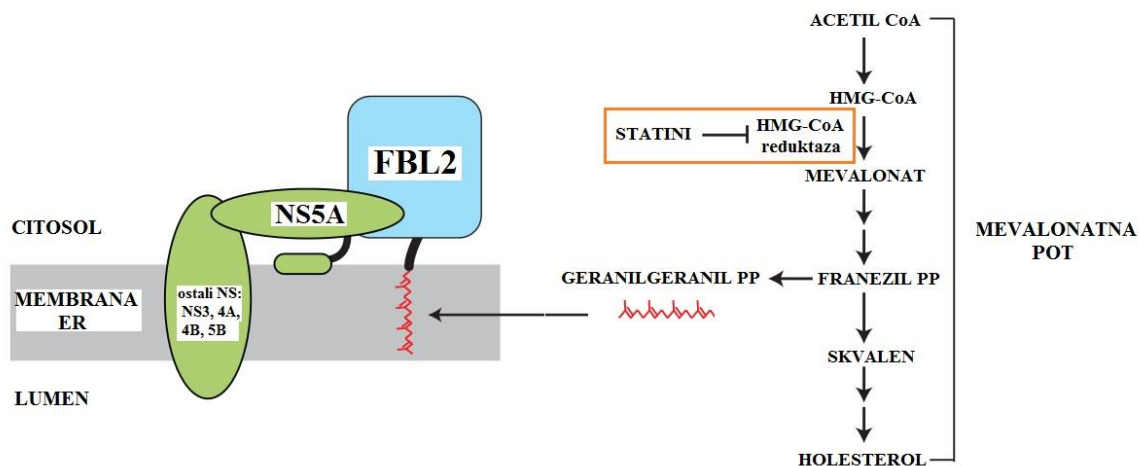
2.6 STATINI IN OKUŽBA Z VIRUSOM HEPATITISA C

Statini so kemijsko in farmakološko heterogena skupina spojin, ki zavirajo glavni encim v sintezni poti holesterola (slika 5). S 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencimom A (HMG-CoA) tekmujejo za vezavo na aktivno mesto encima HMG-CoA reduktaze in nato z reverzibilno vezavo spremenijo konformacijsko strukturo HMG-CoA reduktaze in tako zavrejo sintezo mevalonata in posledično holesterola v hepatocitih (Lunder in sod., 2011). Osnovni učinek statinov je tako zmanjšanje endogene sinteze holesterola v hepatocitih. Ker je ob tem zavirana tudi sinteza ostalih nesteroidnih izoprenoidnih intermediatov (franezilpirofosfat in geranilgeranilpirofosfat), imajo statini vrsto zaščitnih pleiotropnih učinkov. Znano je, da statini izboljšajo delovanje žilnega endotela, povečajo stabilnost aterosklerotičnih plakov, zmanjšujejo agregacijo trombocitov in nastanek trombov ter delujejo protivnetno, antioksidativno in imunomodulatorno (Lunder in sod., 2011; Stancu in Sima, 2001).

2.6.1 Zaviralni učinek statinov na pomnoževanje virusa hepatitisa C

Leta 2003 so Ye in sod. (2003) objavili izsledke raziskave o zaviralnem učinku lovastatina na pomnoževanje HCV. Z raziskavami v celičnih kulturah so ugotovili, da HCV za svoje pomnoževanje potrebuje celični geranilgeranilpirofosfat, ki nastaja znotrajcelično pri sintezi holesterola v hepatocitih. Geranilgeranilpirofosfat služi kot donor prenilne skupine pri posttranslacijski modifikaciji znotrajceličnih beljakovin, ki regulirajo številne celične funkcije. Z uporabo statinov je v hepatocitih zavrta sinteza mevalonata, kar onemogoča sintezo geranilgeranilpirofosfata. Vlogo preniliranih tarčnih molekul pri pomnoževanju HCV RNK pa dodatno podpira odkritje, da so z zaviralcem encima geranilgeranil transferaze, ki sodeluje v prenilaciji celičnih beljakovin, uspeli zavreti virusno pomnoževanje (Ye in sod., 2003). Kapadia in Chisari (2005) sta leta 2005 objavila podobne rezultate.

V letu 2005 je Wang s sod. (2005) objavili rezultate raziskave, v kateri so identificirali tarčno celično beljakovino na membrani endoplazmatskega retikuluma, ki so jo poimenovali FBL2 in je potrebna za pomnoževanje HCV. Z virusno beljakovino NS5A lahko le prenilirana beljakovina FBL2 tvori kompleks, ki je nujno potreben za podvojevanje virusnega genoma. Ker ima celični geranilgeranilpirofosfat ključno vlogo pri prenilaciji beljakovine FBL2, lahko s statini preko reduktaze HMG-CoA zavremo sintezo geranilgeranilpirofosfata, s čemer posredno zavremo pomnoževanje HCV (slika 5) (Kapadia in Chisari, 2005; Wang in sod., 2005; Ye in sod., 2003).



Acetil CoA: acetil koencim A; HMG-CoA: 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A; franezil PP: franezil pirofosfat ; geranilgeranil PP: geranilgeranil pirofosfat; membrana ER: membrana endoplazmatskega retikuluma; NS: virusne nestrukturne beljakovine

Slika 5: Sinteza holesterola preko mevalonatne poti v hepatocitu in pomen geranilgeranilpirofosfata pri pomnoževanju virusa hepatitisa C (povzeto po: Ye, 2007: 1018).

Figure 5: Cholesterol synthesis through the mevalonate pathway. The importance of geranylgeranyl pyrophosphate in hepatitis C virus replication (according to: Ye, 2007: 1018).

Leta 2006 je Ikeda s sod. (2006) objavili izsledke raziskave *in vitro*, v kateri so dokazali zaviralni učinek različnih statinov kot so atorvastatin, FLU, lovastatin in simvastatin na podvojevanje HCV RNK. Najmočnejšo protivirusno aktivnost so zaznali pri FLU. V isti raziskavi so potrdili tudi sinergistični zaviralni učinek FLU v kombinaciji z IFN α . Podobne izsledke raziskav je objavila leta 2007 Kimova s sod. (2007), ter potrdila protivirusno delovanje naslednji statinov: atorvastatin, simvastatin, mevastatin, lovastatin in FLU. Najmočnejše so zavirli podvojevanje virusnega genoma atorvastatin, simvastatin in FLU.

Bader s sod. (2008) je leta 2008 prvi objavil raziskavo zaviralnega učinka monoterapije s FLU na koncentracijo HCV RNK pri bolnikih s CHC. Pri polovici bolnikov, ki so prejeli FLU 20 do 80 mg dnevno, je prišlo do značilnega znižanja plazemske koncentracije HCV RNK ($p < 0,01$) v primerjavi z bolniki, ki FLU niso prejeli. Znižanje virusnega bremena je bilo pri večini bolnikov le prehodno, saj so pri 78 % beležili ponoven porast koncentracije HCV RNK.

Pomembno je poudariti, da so najvišje serumske koncentracije FLU pri človeku od šest do 32-krat nižje od koncentracij FLU v pogojih *in vitro* (Ikeda in sod., 2006; Sabia in sod., 2001). Podatkov o sočasni koncentraciji statinov v serumu in v hepatocitih po njihovem zaužitju do sedaj še ni bilo objavljenih.

2.6.2 Steatoza in metabolizem lipidov pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C

Hepatocelularna steatoza pomeni kopičenje lipidnih kapljic, ki jih pretežno sestavljajo trigliceridi, v jetrnih celicah (Castera in sod., 2005). V splošni populaciji je pojavnost nealkoholne jetrne steatoze med 10 do 24 %. Njena pojavnost se pomembno zveča pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B (od 18 do 27 %) in bolnikih s prekomerno telesno težo (od 57,5 do 74 %) (Angulo, 2002; Castera in sod., 2005; Hui in sod., 2002; Hwang in Lee, 2011; Peng in sod., 2008; Rubbia Brandt in sod., 2004; Thomopoulos in sod., 2006). Raziskave so pokazale, da ima 42 do 73 % bolnikov s CHC jetrno steatozo in da je pojavnost steatoze pri okužbi s HCV kar dvainpolkrat pogostejša od pričakovane pojavnosti v splošni populaciji.

Na razvoj steatoze pri bolnikih s CHC vplivajo številni dejavniki. Pri tistih, ki niso okuženi z genotipom HCV 3, se razvije tako imenovana metabolna steatoza. Ta je posledica vpliva številnih sočasnih dejavnikov tveganja, med katerimi so najpomembnejši starost bolnikov nad 40 let, debelost, hiperlipidemija, sladkorna bolezen, uživanje alkohola in metabolni sindrom (Hwang in Lee, 2011; Poynard in sod., 2003a; Rubbia Brand in sod., 2000; Westin in sod., 2002). Pri bolnikih, okuženih z genotipom HCV 3, pa je steatoza posledica neposredne poškodbe hepatocitov, ki najverjetneje nastane zaradi vpletanja virusa v metabolizem lipidov, kar poruši njihovo hemostazo (Hui in sod., 2002; Kumar in sod., 2002; Rubbia Brand in sod., 2000). Številne klinične raziskave kažejo, da prisotnost steatoze pospeši razvoj fibroze jetrnega tkiva in tako predstavlja neodvisen dejavnik tveganja za napredovanje jetrnega obolenja (Adinolfi in sod., 2001; Monto in sod., 2002; Rubbia Brand in sod., 2004; Westin in sod., 2002)

Castera s sod. (2004) je dokazal, da je pri uspešno zdravljenih bolnikih s CHC, okuženih z

genotipom HCV 3, prišlo do statistično značilnega zmanjšanja maščobne infiltracije jeter. Izboljšanje patohistoloških sprememb jetrnega tkiva po zaključenem zdravljenju je imelo kar 91 % ozdravljenih bolnikov, medtem ko je do izboljšanja prišlo le pri 19 % bolnikov, ki SVR niso dosegli. Pri bolnikih, ki so bili okuženi z ostalimi genotipi HCV, po uspešnem zdravljenju niso zaznali pomembnega zmanjšanja jetrne steatoze. Podobne rezultate sta objavila tudi Poynard s sod. (2003a) in Kumar s sod. (2002).

Virus hepatitisa C je v tesni povezavi z metabolizmom lipidov v telesu preko različnih poti. Sprva imajo pomembno vlogo serumski lipoproteini, saj je večina virusnih delcev v serumu vezana na krožeče serumske lipoproteine, ki vstopijo v hepatocite preko nizkoafinitetnih lipoproteinskih receptorjev (Andre in sod., 2002; Schettler in sod., 2001). Po vstopu virusa v hepatocit je pomnoževanje HCV ponovno odvisno od metabolizma lipidov, saj le-to potrebuje celični geranilgeranilpirofosfat, ki nastaja pri sintezi holesterola v hepatocitih (Ye in sod., 2003; Kapadia in Chisari, 2005). Tudi sproščanje virionov je v tesni povezavi z gostiteljevimi lipidi, predvsem z apolipoproteinom B, ki je del VLDL holesterola (Bassendine in sod., 2011; Gastaminza in sod., 2008; Huang in sod., 2007; Nahmias in sod., 2008).

Klinične raziskave kažejo, da imajo bolniki, kronično okuženi s HCV, nižje serumske ravni skupnega holesterola, trigliceridov in LDL holesterola v primerjavi z zdravimi ljudmi, kar še dodatno potrjuje vpletenost HCV v metabolizem lipidov (Corey in sod., 2009; Dai in sod., 2008). Raziskave pa so tudi pokazale, da so višje ravni skupnega holesterola in LDL holesterola ter nižje ravni trigliceridov in HDL holesterola krvi pred uvedbo zdravljenja CHC neodvisen napovedni dejavnik za SVR (Gopal in sod., 2006; Harrison in sod., 2010; Ramcharran in sod., 2010).

2.6.3 Varnost uporabe statinov pri bolnikih s kroničnim hepatitisom C

V zadnjih letih je vse več objav o varni uporabi različnih statinov pri bolnikih s kronično jetrno boleznijo. Leta 2006 sta dve pomembni svetovni instituciji, Ekspertna skupina za jetra (*angl.* Liver Expert Panel) in Nacionalno združenje za varnost statinov (*angl.*

National Lipid Association Statin Safety Task Force) na temelju številnih kliničnih študij in neodvisnih raziskav ameriškega vladnega urada za zdravila in prehrano (*angl.* United States Food and Drug Administration, FDA) objavili priporočila o varnosti statinov pri bolnikih s kronično jetrno boleznijo, nealkoholnim steatohepatitisom in nealkoholno steatozo (Cohen in sod., 2006; McKenney in sod., 2006). Zdravljenje s statini tako ni kontraindicirano pri bolnikih s kronično jetrno boleznijo, ob predpisovanju statinov pa svetujejo redno spremljanje testov za oceno delovanja jeter (pred uvedbo statina in 12 tednov po njegovi uvedbi oz. zvečanju odmerka). Po podatkih raziskav je prišlo do porasta ravni ALT nad trikratno zgornjo normalno vrednostjo pri manj kot 1 % bolnikov, ki so prejeli majhne (20 mg) in srednje (40 mg) velike odmerke statinov ter pri 2 do 3 % bolnikov, ki so prejeli 80 mg statina dnevno. Zvišanje ravni transaminaz je bilo v večini primerov prehodno, v 70 % so se ravni ALT spontano znižale kljub nadaljevanju zdravljenja s statini. Razlog zvišanja aminotransferaz še ni povsem pojasnjen (Cohen in sod., 2006; Law in Rudnicka, 2006; McKenney in sod., 2006).

Leta 2007 je Lewis s sod. (2007) objavil izsledke prospektivne randomizirane raziskave 630 bolnikov s kompenzirano kronično jetrno boleznijo in hiperholesterolemijo, med katerimi jih je 81 imelo CHC, 38 teh pa je 36 tednov prejelo pravastatin 80 mg dnevno. V primerjavi s kontrolno skupino je bila uporaba statina povsem varna, klinično pomembne hepatotoksičnosti niso zaznali v nobeni skupini, prav tako med raziskavo ni prišlo do akutnega poslabšanja temeljne jetrne bolezni. Chalasani s sod. (2004) je objavil raziskavo, v kateri so potrdili varno uporabo statinov (FLU, atorvastatin in simvastatin) tudi pri bolnikih, ki so imeli že pred njihovo uvedbo zvišane ravni aminotransferaz. V retrospektivni raziskavi o varni uporabi statinov pri bolnikih s CHC je leta 2006 poročal tudi Krishna s sod. (2006). Pri 174 bolnikih s CHC, ki so prejeli različne statine zaradi hiperholesterolemije, ni beležil statistično značilnega zvečanja ravni ALT v primerjavi s skupino bolnikov s CHC, ki statinov niso prejeli, kot tudi ne v primerjavi s skupino bolnikov brez okužbe s HCV, ki so bili zdravljeni s statini. O varni uporabi statinov pri bolnikih s CHC so poročali tudi drugi raziskovalci (Gibson in Rindone, 2005; Henderson in sod., 2010).

3 PREISKOVANCI IN METODE

3.1 ZASNOVA RAZISKAVE

V preiskovano skupino smo prospektivno vključili predhodno nezdravljene (naivne) bolnike s CHC genotipov 1 in 3, ki so začeli zdravljenje v obdobju od septembra 2009 do februarja 2011. Zadnji bolnik v preiskovani skupini je zaključil zdravljenje in 24-tedensko opazovalno obdobje septembra 2012. Vključeni so bili vsi bolniki, ki niso imeli kontraindikacij za uvedbo zdravljenja CHC in so se strinjali z vključitvijo v raziskavo, kar so potrdili s podpisano izjavo.

V raziskavo nismo vključili bolnikov z naslednjimi kontraindikacijami: dekompenzirana jetrna ciroza, sočasna okužba s HBV/HIV, kakršnokoli jetrno obolenje druge etiologije, levkopenija (število levkocitov pod $3.000/\text{mm}^3$), trombocitopenija (število trombocitov pod $75.000/\text{mm}^3$), anemija (raven hemoglobina pod 130 g/l za moške in pod 120 g/l za ženske), nenadzorovana depresija, nezdravljena bolezen ščitnice, nezdravljena avtoimunska bolezen, klinično pomembno srčno-žilno obolenje, slabo obvladana sladkorna bolezen, maligno obolenje, predhodno zdravljenje s statini.

Raziskava je potekala v treh centrih za zdravljenje virusnih hepatitisov: na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, na Oddelku za nalezljive bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Maribor in na Oddelku za infekcijske bolezni in vročinska stanja Splošne bolnišnice Celje.

Pri vseh bolnikih smo pred uvedbo zdravljenja določili virusno breme s kvantitativnim testom PCR (COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HCV Test, Roche Diagnostic Systems), ki ima spodnjo mejo zaznave 30 IU/ml HCV RNK. Mejo med nizko in visoko plazemsko viremijo smo določili pri koncentraciji 400.000 IU/ml HCV RNK. Določili smo tudi genotip HCV z metodo reverzne hibridizacije.

Vsakemu bolniku smo pred uvedbo zdravljenja glede na nacionalne smernice (Matičič in Kastelic, 2009) in hkrati za namen raziskave opravili naslednje laboratorijske preiskave:

- hemogram (raven levkocitov, hemoglobina in trombocitov),

- teste jetrne funkcije: ALT, aspartat transaminazo (AST), gama-glutamil transferazo (GGT),
- krvni sladkor,
- lipidogram (skupni holesterol, trigliceridi, LDL holesterol, HDL holesterol).

Vsak bolnik je imel pred uvedbo zdravljenja opravljeno ultrazvočno preiskavo jeter. Pri večini bolnikov smo nato izvedli tudi jetrno biopsijo. Le-te nismo opravili pri bolnikih z naslednjimi kontraindikacijami: motnje strjevanja krvi, jetrni hemangiomi, alergiji na lokalni anestetik, v primeru odklonitve posega. Patohistološke preglede jetrnega tkiva so opravljali na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za patologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, kjer so ocenjevali gradus nekroinflamatorne aktivnosti (od 0 do 18) in stadij spremenjene zgradbe jeter (od 0 do 4) na podlagi protokola patohistološke diagnoze kroničnega hepatitisa po lestvici METAVIR in delež jetrne steatoze (Bedossa in Poynard, 1996).

Za zdravljenje CHC so preiskovanci prejeli PEG IFN α -2a v odmerku 180 μ g (Pegasys[®]) ali PEG IFN α -2b v odmerku 1,5 μ g/kg telesne teže (PegIntron[®]) enkrat tedensko v obliki podkožnih injekcij in dvakrat dnevno tablete RBV v odmerku 15 mg/kg telesne teže na dan (Rebetol[®], Copegus[®]). Bolniki v preiskovani skupini so ob tem dodatno prejeli še FLU 80 mg dnevno (Lescol XL[®]).

Bolniki v kontrolni skupini so bili zdravljeni s kombinacijo PEG IFN α -2a v odmerku 180 μ g (Pegasys[®]) ali PEG IFN α -2b v odmerku 1,5 μ g/kg telesne teže (PegIntron[®]) enkrat tedensko v obliki podkožnih injekcij in RBV v odmerku 15 mg/kg telesne teže (Rebetol[®], Copegus[®]) v peroralni obliki vsakodnevno.

Tako preiskovance kot bolnike v kontrolni skupini smo zdravili v skladu s slovenskimi nacionalnimi usmeritvami za zdravljenje kroničnega hepatitisa C (Matičič in Kastelic, 2009).

Učinek uvedenega zdravljenja smo spremljali z določanjem HCV RNK štiri tedne (RVR) in 12 tednov (EVR) po uvedbi zdravljenja in ob njegovem zaključku (ETR). Dokončna

ocena uspešnosti je sledila 24 tednov po zaključku zdravljenja; v primeru aviremije je bolnik dosegel trajni virološki odziv (SVR).

Bolniki so imeli predvidene redne kontrolne preglede prva dva meseca vsakih 14 dni, nato mesečno (pogosteje v primeru huje izraženih stranskih učinkov), ob koncu zdravljenja ter 12 in 24 tednov po njegovem zaključku. Zaradi možnosti pojava miopatije kot stranskega učinka statina smo opravljali redne preiskave ravni serumske kreatinske kinaze (CK). Bolnikom v preiskovani skupini smo FLU ukinili, če je med zdravljenjem prišlo do zvišanja ravni aminotranferaz nad petkratno vrednost zgornje referenčne meje ali v primeru trikratnega porasta bolnikove izhodiščne ravni ter, če je raven CK porasla nad petkratno vrednost zgornje referenčne meje.

Laboratorijske preiskave krvi smo opravljali v biokemičnih laboratorijih Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Univerzitetnega kliničnega centra Maribor in Splošne bolnišnice Celje. Mikrobiološko diagnostiko so izvedli v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

3.2 STATISTIČNA ANALIZA

Pred pričetkom raziskave smo izračunali velikost vzorca (stopnja značilnosti $\alpha=5\%$ in moč testa $1-\beta=80\%$) za ugotavljanje razlike v učinkovitosti zdravljenja med preiskovano in kontrolno skupino (MedCalc statistical software version 10.0.2.0; $\alpha=0,05$, $\beta=0,20$). Izračun je pokazal, da za raziskavo potrebujemo v vsaki skupini najmanj 70 bolnikov.

Glede na zasnovo raziskave, ki je vključevala prospektivno preiskovano skupino in historično kontrolno skupino, smo statistično analizirali le tiste bolnike, ki so zaključili zdravljenje in 24 tedensko opazovalno obdobje po njegovem zaključku. Najprej smo preverili ujemanje preiskovane in kontrolne skupine v najpomembnejših gostiteljevih in virusnih dejavnikih, ki vplivajo na SVR. V ta namen smo uporabili Mantel-Haenszelov test za primerjave $2 \times 2 \times 2$ ter test razmerja verjetij za obe skupini po posameznem opredeljenem stratumu za kategorične spremenljivke ter za zvezne spremenljivke Kruskal-

Wallisov test (za obe skupini glede na genotip in vrsto zdravljenja) ali t-test/Mann-Whitneyev U test za obe skupini po stratumu.

Rezultate smo prikazali kot srednje vrednosti spremenljivk \pm standardni odklon (SD) ali kot deleže posameznih spremenljivk. Mejo statistične značilnosti med preiskovanima skupinama smo postavili pri $p < 0,05$. Povezanost med spremenljivkami smo izrazili z razmerjem obetov (*angl.* odds ratio, OR).

Statistična analiza je bila opravljena s programsko opremo PASW 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Združene države Amerike).

3.3 MNENJE KOMISIJE REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko v skladu z upoštevanjem pravila dobre klinične prakse (ICH/GCP) in vse zadevne zakonske predpise, ki veljajo v Republiki Sloveniji.

4 REZULTATI

4.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV V PREISKOVANI IN KONTROLNI SKUPINI

V raziskavo smo vključili skupno 179 predhodno še nezdravljenih (naivnih) bolnikov s CHC, okuženih z genotipom 1 ali genotipom 3. V preiskovano skupino je bilo vključenih 81 bolnikov, ki so poleg SOC prejeli tudi FLU v odmerku 80 mg dnevno ves čas zdravljenja. V kontrolno skupino smo vključili 98 naivnih bolnikov s CHC, okuženih z genotipom 1 ali genotipom 3, ki so bili zdravljeni le s SOC v skladu z istimi nacionalnimi smernicami kot smo zdravili preiskovance.

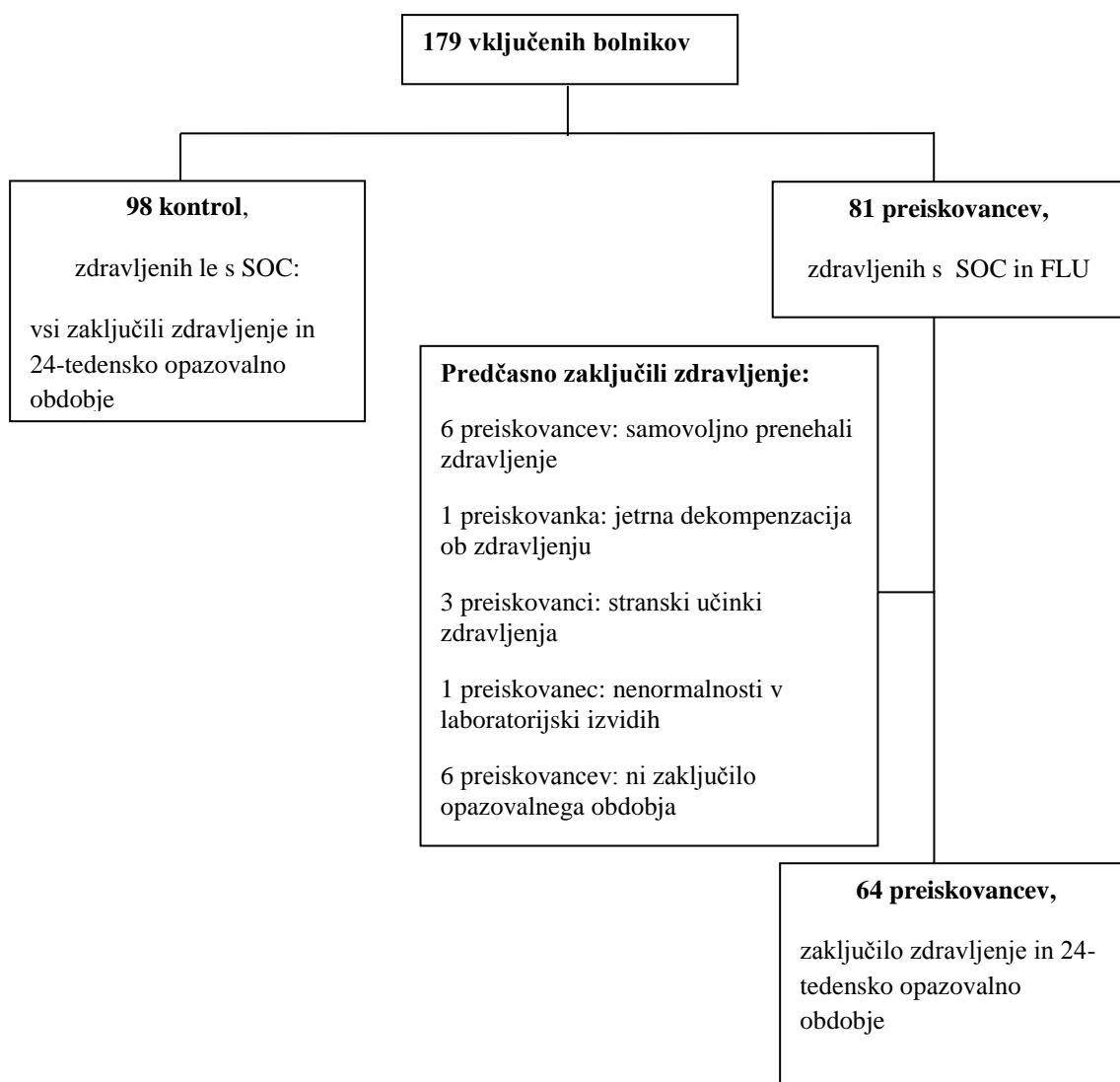
Iz preiskave smo izključili vse tiste preiskovance, ki niso zaključili zdravljenja in 24-tedenskega opazovalnega obdobja, saj so ta kriterij vključevale tudi vse historične kontrole.

Iz preiskovane skupine je bilo med samim zdravljenjem izključenih 11 bolnikov. Vzroki za predčasno prekinitve zdravljenja so bili naslednji:

- samovoljno prenehanje zdravljenja (šest preiskovancev),
- ogrožujoče nenormalnosti v laboratorijskih preiskavah (en preiskovanec),
- jetrna dekompenzacija med zdravljenjem (ena preiskovanka) in
- pojav stranskih učinkov zdravljenja (trije preiskovanci).

Iz raziskave smo izključili tudi šest preiskovancev po zaključenem zdravljenju, saj niso končali 24-tedenskega opazovalnega obdobja in zato nismo mogli opredeliti učinkovitosti zdravljenja.

Na sliki 6 je prikazan natančnejši potek raziskave in vzroki za izključitev bolnikov iz raziskave.



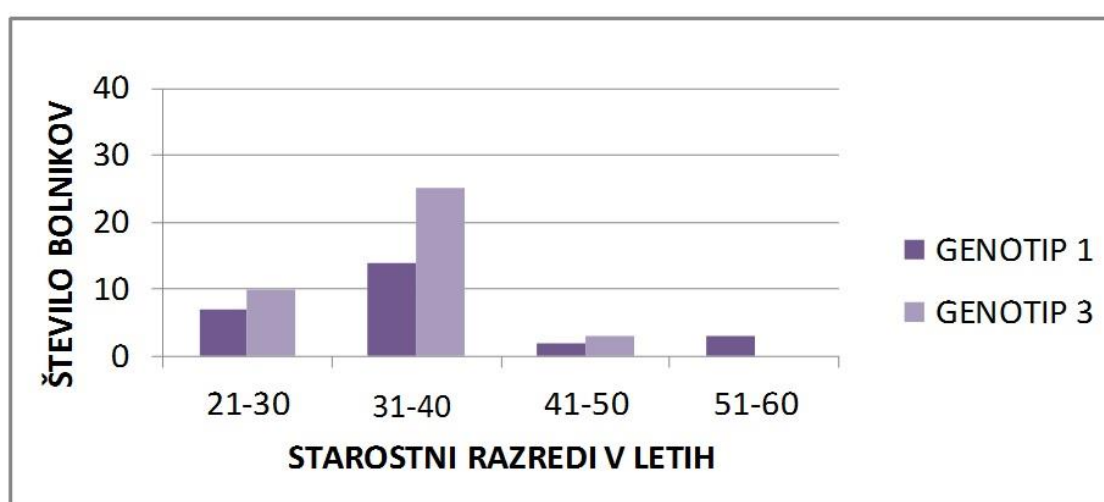
SOC: standardna kombinacija zdravljenja; FLU: fluvastatin

Slika 6: Prikaz poteka raziskave.

Figure 6: Trial profile.

4.1.1 Osnovne značilnosti bolnikov v preiskovani skupini

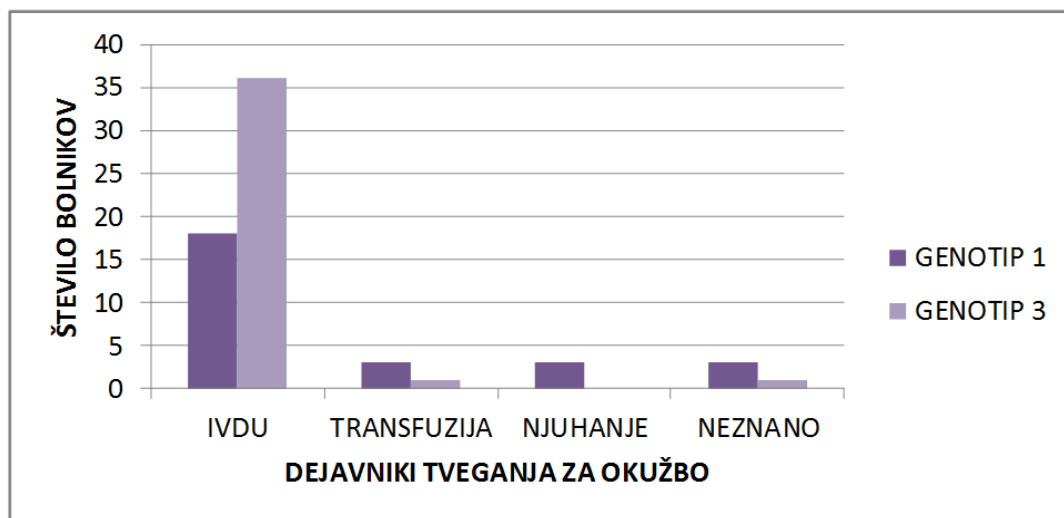
Med 64 preiskovanci s CHC, ki so prejeli dodatno FLU, jih je bilo 26 (41 %) okuženih z genotipom 1 in 38 (59 %) z genotipom 3. Skupno je bilo vključenih 45 (70 %) moških in 19 (30 %) žensk. Povprečna starost v preiskovani skupini je bila 33,8 let. Najmlajši je bil star 22 let in najstarejši 54 let (slika 7).



Slika 7: Preiskovanci razdeljeni v starostne razrede in glede na genotip virusa hepatitisa C.

Figure 7: The fluvastatin group according to age groups and hepatitis C virus genotype.

Največ preiskovancev (83 %) je kot način okužbe navajalo intravensko uživanje nedovoljenih drog, drugi najpogostejši način okužbe je bilo prejetje transfuzije krvi ali krvnih pripravkov (6 %), njuhanje drog kot dejavnik tveganja za okužbo je navajalo 5 % preiskovancev. Pri 6 % preiskovancev je način okužbe s HCV ostal nepojasnen. Nihče od bolnikov ni navajal drugih možnih dejavnikov tveganja za okužbo (slika 8).



IVDU: intravenski uživalci nedovoljenih drog (*angl.* intravenous drug users)

Slika 8: Preiskovanci razdeljeni glede na dejavnike tveganja za okužbo z virusom hepatitisa C.

Figure 8: The fluvastatin group according to routs of hepatitis C virus transmission.

Pred uvedbo zdravljenja je 88 % preiskovancev imelo zvišane ravni ALT, 77 % zvišane ravni AST in 40 % zvišane ravni GGT. Med preiskovanci z zvišanimi ravni ALT je bila najvišja vrednost 6,74 μ kat/l, kar predstavlja devetkratno zvišanje nad zgornjo referenčno mejo.

Večina preiskovancev (61 %) je imela pred uvedbo zdravljenja normalen BMI (od 18,5 do 25), 34 % jih je imelo prekomerno telesno težo (BMI od vključno 25 do 30), manjši delež (5 %) pa je imel BMI nad 30 (območje debelosti).

Pri bolnikih smo pred uvedbo zdravljenja določili vrednosti lipidov v krvi. V normalnem območju je imelo holesterol 42 % preiskovancev (od 4 do 5,2 mmol/l), LDL holesterol 56 % preiskovancev (od 2 do 3,5 mmol/l), HDL holesterol 30 % preiskovancev (od 1,4 do 2,8 mmol/l) in trigliceride 81 % preiskovancev (do 1,7 mmol/l). Natančnejša opredelitev lipidograma pred uvedbo zdravljenja je prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Lipidogram preiskovancev pred uvedbo zdravljenja kroničnega hepatitisa C glede na genotip.

Table 1: The fluvastatin group baseline lipid levels according to genotype.

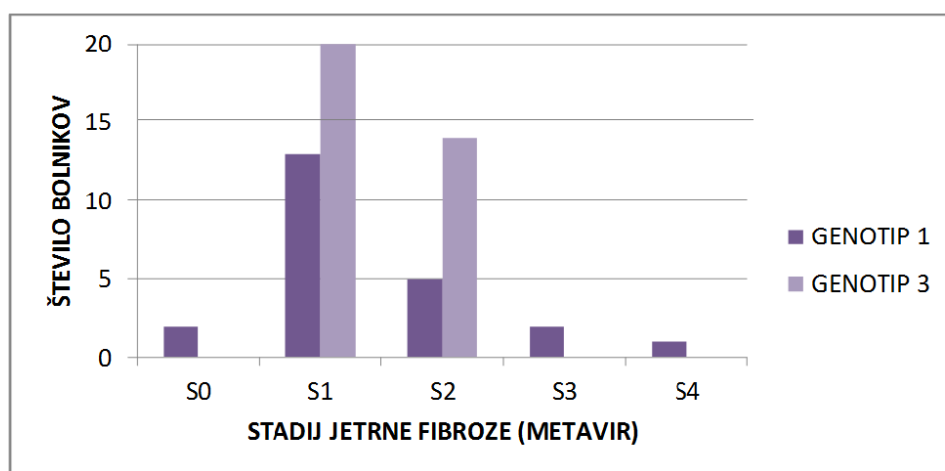
LIPIDOGRAM	Vsi bolniki	Genotip 1	Genotip 3
pred uvedbo zdravljenja	N=64	N=26	N=38
	n (%)	n (%)	n (%)
Holesterol (mmol/l)			
<4	24 (38)	6 (23)	18 (47)
<u>4-5,2</u>	27 (42)	15 (58)	12 (32)
>5,2	11 (17)	5 (19)	6 (16)
Manjkajoč podatek	2 (3)	0	2 (6)
LDL holesterol (mmol/l)			
<2	15 (23)	3 (12)	12 (31)
<u>2-3,5</u>	36 (56)	16 (62)	20 (53)
>3,5	8 (13)	4 (14)	4 (10)
Manjkajoč podatek	5 (8)	3 (12)	2 (6)
HDL holesterol (mmol/l)			
<1,4	34 (53)	12 (46)	22 (58)
<u>1,4-2,8</u>	25 (39)	11 (42)	14 (37)
>2,8	0	0	0
Manjkajoč podatek	5 (8)	3 (12)	2 (5)
Trigliceridi (mmol/l)			
<u>do 1,7</u>	52 (81)	21 (81)	31 (82)
>1,7	10 (16)	5 (19)	5 (13)
Manjkajoč podatek	2 (3)	0	2 (5)

Odebeljene in podčrtane so normalne referenčne vrednosti. LDL holesterol: lipoprotein nizke gostote; HDL holesterol: lipoprotein visoke gostote;

Vsi preiskovanci so imeli pred uvedbo zdravljenja prisotno plazemsko viremijo HCV RNK, od tega jih je 27 % imelo nizko izhodiščno viremijo (HCV RNK $\leq 400\,000$ IU/ml). Visoka plazemska viremija je bila v razponu od najmanj 438.726 IU/ml do največ 19.063.006 IU/ml. Povprečno virusno breme je bilo 2.879.793 IU/ml.

Pred uvedbo zdravljenja je bila pri 57 (89 %) preiskovancih opravljena jetrna biopsija. Pri 11 % preiskovancev zaradi kontraindikacij biopsija ni bila opravljena. Večina preiskovancev (72 %) je imela v jetrnem vzorcu le blage nekroinflamatorne spremembe (gradus od 4 do 8), 9 % bolnikov je imela zmerne vnetne spremembe (gradus od 9 do 12), 8 % le minimalne vnetne spremembe (gradus od 0 do 3), nihče od bolnikov ni imel hudih vnetnih sprememb (gradus nad 12).

Večji del preiskovancev (55 %) je imelo le minimalno izražene fibrozne spremembe (stadij 0 do 1), 30 % bolnikov je imelo periportalno fibrozo (stadij 2), pri 3 % je bila že razvita nestabilna ciroza (stadij 3) in le en bolnik je imel razvito cirozo jeter (stadij 4) (slika 9).



S: stadij fibroze po lestvici METAVIR

Slika 9: Razdelitev preiskovancev glede na stadij jetrne fibroze in genotip virusa hepatitisa C.

Figure 9: The fluvastatin group according to fibrosis stage and genotype hepatitis C virus.

S patohistološkim pregledom jetrnega tkiva smo določili tudi stopnjo jetrne steatoze. Pri 41 (64 %) preiskovancih je bila maščobna degeneracija minimalna (pod 5 % jetrnega parenhima), 16 (25 %) pa jih je imelo obsežnejše spremembe.

Osnovne značilnosti preiskovancev, razdeljene glede na vrsto genotipa HCV, so predstavljene v preglednicah 2 in 3.

Preglednica 2: Osnovne značilnosti preiskovancev (v deležih) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C.

Figure 2: Baseline patients characteristics (percentage) in the fluvastatin group according to hepatitis C virus genotype.

OSNOVNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV	GENOTIP 1 N=26 n (%)	GENOTIP 3 N=38 n (%)
Spol		
moški	19 (73)	26 (68)
ženske	7 (27)	12 (32)
Starost (leta)		
≤40	21 (81)	35 (92)
>40	5 (19)	3 (8)
Dejavniki tveganja		
Intravensko uživanje drog	17 (65)	36 (94)
Transfuzija	3 (12)	1 (3)
Drugo ali neznano	6 (23)	1 (3)
BMI (kg/m²)		
≤30	24 (92)	36 (95)
>30	2 (8)	2 (5)
HCV RNK (IU/mL)		
≤400.000	6 (23)	11 (29)
>400.000	20 (77)	27 (71)
Stadij fibroze (METAVIR)		
0-1	15 (57)	20 (52)
2	5 (19)	14 (37)
3-4	3 (12)	0 (0)
Manjkajoči podatki	3 (12)	4 (11)
Steatoza		
< 5 %	18 (69)	23 (60)
≥ 5 %	5 (19)	11 (29)
Manjkajoči podatki	3 (12)	4 (11)

BMI: indeks telesne mase; HCV RNK: ribonukleinska kislina virusa hepatitisa C

Preglednica 3: Osnovne značilnosti preiskovancev (povprečje, mediana, standardni odklon) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C.

Table 3: Baseline patients characteristics (average, median, standard deviation) in the fluvastatin group according to hepatitis C virus genotype.

OSNOVNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV	GENOTIP 1 N=26 \bar{x} (M; SD)	GENOTIP 3 N=38 \bar{x} (M; SD)
Starost (leta)	35,2 (32; 9)	32,8 (33; 4,9)
Glukoza na tešče (mmol/L)	5,3 (5; 2,1)	5 (5; 0,6)
BMI (kg/m²)	25,1 (24; 3,5)	25 (25; 3,7)
Jetrni testi (μkat/l)		
ALT	1,7 (1,3; 1,6)	1,7 (1,4; 1,2)
AST	1 (0,8; 0,7)	1,1 (0,9; 0,6)
GGT	1 (0,9; 1)	1 (0,6; 0,9)
Lipidogram (mmol/L)		
Holesterol	4,5 (4,4; 0,9)	4,2 (3,9; 1,1)
Trigliceridi	1,2 (1,15; 0,6)	1,2 (1,1; 0,8)
HDL holesterol	1,4 (1,3; 0,3)	1,3 (1,2; 0,4)
LDL holesterol	2,7 (2,7; 0,7)	2,3 (2,2; 0,9)
HCV RNK (IU/ml)	2.516.901 (999.649; 2.960.260)	3.128.088 (1.637.472; 4.470.246)

\bar{x} : povprečje; M: mediana; SD: standardni odklon; BMI: indeks telesne mase; ALT: alanin transaminaza; AST: aspartat transaminaza; GGT: gama-glutamyl transferaza; HDL: lipoprotein visoke gostote; LDL holesterol: lipoprotein nizke gostote; HCV-RNK: ribonukleinska kislina virusa hepatitisa C

4.1.2 Osnovne značilnosti bolnikov v kontrolni skupini

V kontrolno skupino smo vključili 98 naivnih bolnikov, ki so bili zdravljeni v skladu z istimi nacionalnimi smernicami za zdravljenje hepatitisa C, na temelju katerih smo zdravili bolnike v preiskovani skupini (Matičič in Kastelic, 2009).

Med 98 bolniki je bilo 59 (60 %) moških in 39 (40 %) žensk s povprečno starostjo 35,9 let (od 20 do 65 let). Večina bolnikov (73 %) je bila starih 40 let ali manj. Okužbo z genotipom 1 je imelo 45 (46 %) bolnikov, 53 (64 %) pa okužbo z genotipom 3.

Najpogostejši način okužbe je bil prenos pri intravenskem uživanju drog (72 %), ostali vzroki so bili redkejši. Bolniki so v 10 % navajali prejetje transfuzije ali krvnih pripravkov, en (1 %) bolnik je imel opravljeno neprofesionalno tetovažo, kar v 16 % pa je bil vzrok okužbe nejasen. Nihče ni navajal med dejavniki tveganja njuhanje drog, incidenta na delovnem mestu ali spolnega odnosa z okuženo osebo.

Večina bolnikov (58 %) je imela normalen BMI (od 18,5 do 25), ena (1 %) bolnica je bila podhranjena (BMI 16), kar 36 % so bili prekomerno prehranjeni (BMI od vključno 25 do 30), manjši delež bolnikov (4 %) je imelo BMI nad 30 (območje debelosti).

Pri 85 % bolnikov smo beležili zvišane ravni ALT nad zgornjo referenčno mejo, 68 % bolnikov je imelo zvišane ravni AST in 34 % zvišane ravni GGT. Med bolniki z zvišanimi ravnmi ALT je bila najvišja vrednost 7,63 μ kat/l, kar predstavlja desetkratno zvišanje nad zgornjo referenčno mejo.

Pri bolnikih smo pred uvedbo zdravljenja določili vrednosti lipidov v krvi, vendar pri posameznih frakcijah lipidograma podatki niso bili na voljo kar v 36 %. Od pridobljenih podatkov je 52 % bolnikov imelo holesterol v normalnem območju (od 4 do 5,2 mmol/l), 62 % v normalnem območju LDL holesterol (od 2 do 3,5 mmol/l), 49 % v normalnem območju HDL holesterol (od 1,4 do 2,8 mmol/l) in 78 % normalne ravni trigliceridov (do 1,7 mmol/l).

Pred uvedbo zdravljenja so vsi bolniki imeli prisotno plazemsko viremijo HCV, od tega jih je 45 (46 %) imelo nizko izhodiščno viremijo (HCV RNK \leq 400 000 IU/ml). Pri 54 %

bolnikov smo beležili HCV RNK $>400\ 000$ IU/ml. Povprečno virusno breme historičnih kontrol je bilo 1.863.612 IU/ml.

Pri 85 % bolnikih je bila pred uvedbo zdravljenja opravljena jetrna biopsija; zaradi kontraindikacij le-ta ni bila opravljena pri 15 %. Večina bolnikov (83 %) je imela v vzorcih jeter prisotne blage nekroinflamatorne spremembe (gradus 8 ali manj), eden (1 %) od bolnikov je imel prisotne zmerne spremembe, nihče pa ni imel hudih nekroinflamatornih sprememb (gradus nad 12).

Minimalno izražene fibrozne spremembe je imelo 48 % bolnikov (stadij 0 do 1), 24 % jih je imelo periportalno fibrozo (stadij 2), pri 9 % je bila že razvita nestabilna ciroza (stadij 3), dva (2 %) bolnika sta imela razvito cirozo jeter (stadij 4).

Osnovne značilnosti historičnih kontrol so prikazane v preglednicah 4 in 5.

Preglednica 4: Osnovne značilnosti bolnikov v kontrolni skupini (v deležih) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C.

Table 4: Baseline patients characteristics in the control group (percentage) according to hepatitis C virus genotype.

OSNOVNE ZNAČILNOSTI	GENOTIP 1	GENOTIP 3
KONTROL	N=45	N=53
	n (%)	n (%)
Spol		
Moški	26 (58)	33 (62)
Ženske	19 (42)	20 (38)
Starost (leta)		
≤40	27 (60)	45 (85)
>40	18 (40)	8 (15)
Dejavniki tveganja		
Intravensko uživanje drog	25 (56)	46 (87)
Transfuzija	8 (18)	2 (4)
Ostalo ali neznano	12 (27)	5 (9)
BMI (kg/m²)		
≤30	42 (93)	52 (98)
>30	3 (7)	1 (2)
HCV RNK (IU/mL)		
≤400.000	23 (51)	22 (42)
>400.000	22 (49)	31 (58)
Stadij fibroze (METAVIR)		
0-1	19 (42)	29 (55)
2	10 (22)	14 (26)
3-4	8 (18)	3 (6)
Manjkajoči podatki	8 (18)	7 (13)
Steatoza		
< 5 %	29 (64)	35 (66)
≥ 5 %	8 (18)	11 (21)
Manjkajoči podatki	2 (18)	7 (13)

BMI: indeks telesne mase; HCV RNK: ribonukleinska kislina virusa hepatitisa C ; ALT: alanin transaminaza; AST: aspartat transaminaza; GGT: gama-glutamil transferaza; HDL holesterol: lipoprotein visoke gostote; LDL holesterol: lipoprotein nizke gostote

Preglednica 5: Osnovne značilnosti bolnikov v kontrolni skupini (povprečje, mediana, standardni odklon) pred uvedbo zdravljenja glede na genotip virusa hepatitisa C.

Table 5: Baseline patients characteristics in the control group (average, median, standard deviation) according to hepatitis C virus genotype.

OSNOVNE ZNAČILNOSTI	GENOTIP 1	GENOTIP 3
KONTROL	N=45	N=53
	\bar{x} (M; SD)	\bar{x} (M; SD)
Starost (leta)	39,6 (35; 11,2)	32,8 (32; 7,9)
Glukoza na tešče (mmol/L)	5 (4,9; 0,5)	4,9 (4,9; 0,6)
BMI (kg/m²)	24,7 (24; 3,6)	23,8 (23; 3,3)
Jetrni testi (μkat/l)		
ALT	1,6 (0,9; 1,5)	1,8 (1,5; 1,4)
AST	1 (0,7; 0,9)	1 (0,9; 0,6)
GGT	0,9 (0,6; 0,8)	0,8 (0,6; 1,2)
Lipidogram (mmol/L)		
Holesterol	4,7 (4,8; 0,9)	4,2 (4,3; 0,9)
Trigliceridi	1,3 (1,2; 0,4)	1,4 (1,2; 0,9)
HDL holesterol	1,5 (1,4; 0,5)	1,3 (1,2; 0,3)
LDL holesterol	2,5 (2,5; 0,9)	2,3 (2,2; 0,7)
HCV RNK (IU/ml)	2.171.874 (397.632; 4.447.768)	1.601.880 (476.512; 2.720.844)

\bar{x} : povprečje; M: mediana; SD: standardni odklon; BMI: indeks telesne mase; ALT: alanin transaminaza; AST: aspartat transaminaza; GGT: gama-glutamil transferaza; HDL: lipoprotein visoke gostote; LDL holesterol: lipoprotein nizke gostote; HCV RNK: ribonukleinska kislina virusa hepatitisa C

4.1.3 Razlike v osnovnih značilnostih med preiskovano in kontrolno skupino

Glede na zasnovano raziskavo, ki je vključevala prospektivno preiskovano skupino in historično kontrolno skupino, smo najprej opravili bivariatno analizo tistih osnovnih značilnostih, ki predstavljajo najpomembnejše napovedne dejavnike uspešnosti zdravljenja.

Bolnike smo primerjali glede na vrsto genotipa HCV, starost (≤ 40 let vs. > 40 let), nizko vs. visoko plazemsko viremijo (≤ 400.000 vs. > 400.000 IU/ml), nizek vs. visok BMI (≤ 30 vs. > 30), stadij jetrne fibroze ter izhodiščne ravni LDL holesterola in trigliceridov. Med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike glede vrste genotipa HCV, starosti, BMI, stadija jetrne fibroze in izhodiščne ravni LDL holesterola in trigliceridov. Ugotovili smo statistično značilno razliko v koncentraciji virusnega bremena kot tudi v deležih bolnikov z visoko in nizko plazemsko viremijo. V preiskovani skupini je bilo prisotno statistično značilno višje virusno breme kot v kontrolni skupini ($p=0,023$). V preiskovani skupini je bilo statistično značilno ($p=0,01$) več bolnikov (73 %) z visoko plazemsko viremijo (HCV RNK > 400.000 IU/ml) kot med kontrolami (54 %).

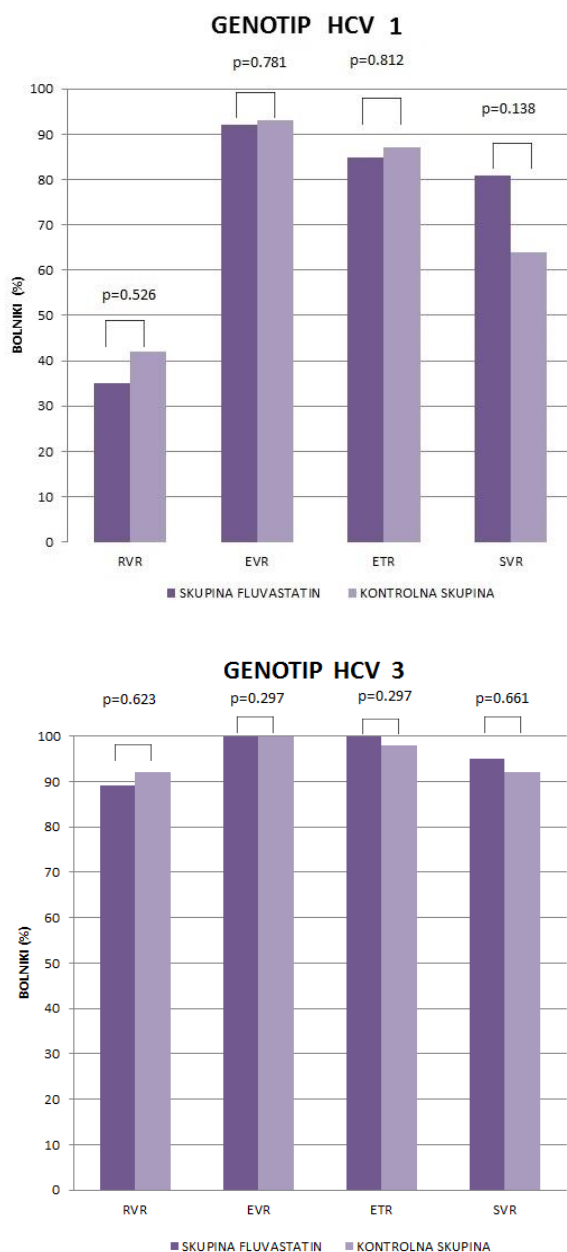
4.2 VIROLOŠKI ODZIV NA ZDRAVLJENJE KRONIČNEGA HEPATITISA C

4.2.1 Virološki odzivi bolnikov v preiskovani in kontrolni skupini in primerjava med skupinama

Ne glede na genotip HCV, je SVR doseglo 89 % bolnikov v preiskovani skupini in 79,6 % v kontrolni skupini ($p=0,12$).

V preiskovani skupini so bolniki z genotipom 1 dosegli RVR v 35 %, EVR v 92 % in ETR v 85 %, medtem ko so v kontrolni skupini dosegli RVR v 42 %, EVR v 93 % in ETR v 87%. Bolniki z genotipom 3 so v preiskovani skupini dosegli RVR v 89 %, EVR v 100 % in ETR v 100 %, medtem ko so v kontrolni skupini dosegli RVR v 92 %, EVR v 100 % in ETR v 98%. Virološki odzivi med posameznimi obdobji zdravljenja se med obema skupinama niso statistično značilno razlikovali (slika 10).

Enainosemdeset odstotkov preiskovancev in 64 % kontrol z genotipom 1 je doseglo SVR. Bolniki z genotipom 3 so v preiskovani skupini dosegli SVR v 95 % in v 92 % v kontrolni skupini. Med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike med virološkim odzivom po zaključenem zdravljenju in opazovalnem obdobju (SVR).



Slika 10: Primerjava viroloških odzivov na zdravljenje med preiskovano (fluvastatin) in kontrolno skupino glede na genotip virusa hepatitisa C.

Figure 10: Comparison of virological response rates to treatment between the fluvastatin group and the control group according to hepatitis C virus genotype.

Preiskovanci z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml) so v preiskovani skupini dosegli RVR v 67 %, EVR v 100 % in ETR v 100 %, medtem ko so v kontrolni skupini z nizko viremijo dosegli RVR v 65 %, EVR v 91 % in ETR v 91 % (preglednica 6). Med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike v viroloških odzivih med zdravljenjem.

V tej preiskovani skupini smo beležili SVR v 100 %, medtem ko so bolniki iz kontrolne skupine z nizko viremijo dosegli SVR v 87 %. Razlika med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,224$).

Preglednica 6: Virološki odzivi pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml).

Table 6: Virological response rates in patients and controls with genotype 1 and low baseline viral load (HCV RNA $\leq 400,000$ IU/ml).

		HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml		
		Preiskovana skupina	Kontrolna skupina	p-vrednost
		N=6	N=23	
		n (%)	n (%)	
RVR	Da	4 (67)	15 (65)	0,947
	Ne	2 (33)	8 (35)	
	Skupno	6 (100)	23 (100)	
EVR	cEVR	6 (100)	21 (91)	0,617
	pEVR	0 (0)	1 (4.5)	
	Ne	0 (0)	1 (4.5)	
	Skupno	6 (100)	23 (100)	
ETR	Da	6 (100)	21 (91)	0,326
	Ne	0 (0)	2 (9)	
	Skupno	6 (100)	23(100)	
SVR	Da	6 (100)	20 (87)	0,224
	Ne	0 (0)	3 (13)	
	Skupno	6 (100)	23 (100)	

RVR: hitri virološki odziv; EVR: zgodnji virološki odziv; cEVR: popolni zgodnji virološki odziv; pEVR: delni zgodnji virološki odziv; ETR: virološki odziv ob zaključku zdravljenja; SVR: trajni virološki odziv

Preiskovanci z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml) so dosegli RVR v 25 %, EVR v 89,5 % in ETR v 80 %, medtem ko so v kontrolni skupini z visoko viremijo dosegli RVR v 18 %, EVR v 91 % in ETR v 82 % (preglednica 7). Med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike v viroloških odzivih med posameznimi obdobji zdravljenja. Pri 75 % preiskovancev z genotipom 1 in visoko plazemsko viremijo smo beležili SVR, medtem ko so v kontrolni skupini dosegli SVR le v 41 %, kar predstavlja statistično značilno razliko ($p=0,024$).

Preglednica 7: Virološki odzivi pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml).

Table 7: Virological response rates in patients and controls with genotype 1 and high baseline viral load (HCV RNK >400,000 IU/ml).

		HCV RNK >400.000 IU/ml		
		Preiskovana skupina	Kontrolna skupina	p-vrednost
		N= 20	N= 22	
		n (%)	n (%)	
RVR	Da	5 (25)	4 (18)	0,591
	Ne	15 (75)	18 (82)	
	Skupno	20 (100)	22 (100)	
EVR	cEVR	15 (79)	15 (68)	0,574
	pEVR	2 (10.5)	5 (23)	
	Ne	2 (10.5)	2 (9)	
	Skupno	20 (100)	22 (100)	
ETR	Da	16 (80)	18 (82)	0,881
	Ne	4 (20)	4 (18)	
	Skupno	20 (100)	22 (100)	
SVR	Da	15 (75)	9 (41)	0,024
	Ne	5 (25)	13 (59)	
	Skupno	20 (100)	22 (100)	

RVR: hitri virološki odziv; EVR: zgodnji virološki odziv; cEVR: popolni zgodnji virološki odziv; pEVR: delni zgodnji virološki odziv; ETR: virološki odziv ob zaključku zdravljenja; SVR: trajni virološki odziv

Preiskovanci z genotipom 3 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml) so dosegli RVR v 100 %, EVR v 100 % in ETR v 100 %, medtem ko so v kontrolni skupini z nizko viremijo dosegli RVR v 91 %, EVR 100 % in ETR v 95 % (preglednica 8). Med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike v viroloških odzivih v posameznih obdobjih med zdravljenjem. Pri vseh bolnikih v preiskovani skupini smo beležili SVR, medtem ko so bolniki v kontrolni skupini dosegli SVR v 95 %. Razlika med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,363$).

Preglednica 8: Virološki odziv pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 3 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml).

Table 8: Virological response rates in patients and controls with genotype 3 and low baseline viral load (HCV RNK $\leq 400,000$ IU/ml).

		HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml		
		Preiskovana skupina	Kontrolna skupina	p-vrednost
		N=11	N=22	
		n (%)	n (%)	
RVR	Da	11 (100)	20 (91)	0,194
	Ne	0 (0)	2 (9)	
	Skupno	11 (100)	22 (100)	
EVR	cEVR	11 (100)	21 (96)	0,363
	pEVR	0 (0)	1 (4)	
	Ne	0 (0)	0 (0)	
	Skupno	11 (100)	22 (100)	
ETR	Da	11 (100)	21 (95)	0,363
	Ne	0 (0)	1 (5)	
	Skupno	11 (100)	22 (100)	
SVR	Da	11 (100)	21 (95)	0,363
	Ne	0 (0)	1 (5)	
	Skupno	11 (100)	22 (100)	

RVR: hitri virološki odziv; EVR: zgodnji virološki odziv; cEVR: popolni zgodnji virološki odziv; pEVR: delni zgodnji virološki odziv; ETR: virološki odziv ob zaključku zdravljenja; SVR: trajni virološki odziv

Preiskovanci z genotipom 3 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml) so dosegli RVR v 85 %, EVR v 100 % in ETR v 100 %, medtem ko so v kontrolni skupini z visoko viremijo dosegli RVR v 94 %, EVR 100 % in ETR v 100 % (preglednica 9). Med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike v viroloških odzivih med posameznimi obdobji zdravljenja. Pri 93 % preiskovanceh z genotipom 3 in visoko plazemsko viremijo smo beležili SVR, medtem ko so v kontrolni skupini dosegli SVR v 90 %. Razlika ni bila statistično značilna ($p=0,758$).

Preglednica 9: Virološki odzivi pri preiskovancih in kontrolah z genotipom 3 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml).

Table 9: Virological response rates in patients and controls with genotype 3 and high baseline viral load (HCV RNK >400,000 IU/ml).

		HCV RNK >400.000 IU/ml		
		Preiskovana skupina	Kontrolna skupina	p-vrednost
		N=27	N=31	
		n (%)	n (%)	
RVR	Da	23 (85)	29 (94)	0.295
	Ne	4 (15)	2 (6)	
	Skupno	27 (100)	31 (100)	
EVR	cEVR	27 (100)	31 (100)	NR
	pEVR	0 (0)	0 (0)	
	Ne	0 (0)	0 (0)	
	Skupno	27 (100)	31 (100)	
ETR	Da	27 (100)	31 (100)	NR
	Ne	0 (0)	0 (0)	
	Skupno	27 (100%)	31 (100)	
SVR	Da	25 (93)	28 (90)	0.758
	Ne	2 (7)	3 (10)	
	Skupno	27 (100)	31 (100)	

RVR: hitri virološki odziv; EVR: zgodnji virološki odziv; cEVR: popolni zgodnji virološki odziv; pEVR: delni zgodnji virološki odziv; ETR: virološki odziv ob zaključku zdravljenja; SVR: trajni virološki odziv ; NR: ni razlike

4.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na trajni virološki odziv

Pri logistični regresiji smo najprej opravili bivariatno analizo dejavnikov, ki vplivajo na uspešnost zdravljenja, na temelju katerih lahko razlikujemo bolnike, ki bodo dosegel SVR in tiste, ki SVR ne bodo dosegli. Pri analizi vseh bolnikov smo ugotovili, da vrsta zdravljenja (SOC ali kombinacija SOC in FLU) ne vpliva na SVR. S tovrstno analizo pa smo ugotovili, da genotip HCV, s katerim je bolnik okužen, starost bolnika ob uvedbi zdravljenja, virusno breme pred uvedbo zdravljenja in razširjenost jetrne steatoze vplivajo na SVR.

Ugotovili smo, da so okužba z genotipom 3 ($p < 0,001$), starost bolnika ob pričetku zdravljenja ≤ 40 let ($p < 0,001$), jetrna steatoza $< 5\%$ ($p = 0,01$) in nizko izhodiščno virusno breme HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml ($p < 0,001$) statistično značilno pomembni napovedni kazalci za SVR.

Podrobnejši statistični podatki bivariatne analize so predstavljeni v preglednici 10.

Preglednica 10: Bivariatna analiza dejavnikov, ki vplivajo na trajni virološki odziv.

Table 10: Results of bivariate logistic regression in predicting the sustained virological response.

Kategorialna spremenljivka	Bivariatna analiza OR (95% CI)	p-vrednost
Genotip 1	5,9 (2,3; 15,7)	< 0,001
Kontrolna skupina	2,1 (0,8; 5,3)	0,12
Starost nad 40 let	24,7 (8,9; 68,7)	< 0,001
Stadij fibroze (0-1)	0,6 (0,2; 1,4)	0,22
BMI (≤ 30)	0,6 (0,1; 3)	0,52
Jetrna steatoza ($< 5\%$)	0,3 (0,1; 0,7)	0,01
Trigliceridi	1,4 (0,6; 3)	0,43
LDL holesterol	1,3 (0,6; 2,6)	0,47
HCV RNK (≤ 400.000)	0,2 (0,08; 0,7)	0,01

BMI: indeks telesne mase; CI: interval zaupanja; LDL holesterol: lipoprotein nizke gostote; HCV: virus hepatitisa C; OR: razmerja obetov; RNK: ribonukleinska kislina

Nato smo opravili multivariatno analizo, vendar lipidograma zaradi prevelikega števila manjkajočih vrednosti vanjo nismo vključil. Tovrstna analiza je podala podobne ugotovitve kot bivariatna analiza, razlikujejo se le razmerja obetov zaradi sovplivanja analiziranih dejavnikov.

Tako smo z multivariatno logistično regresijo ugotovili, da vrsta zdravljenja ($p=0,46$), stadij jetrne fibroze ($p=0,75$) in BMI ($p=0,81$) ne predstavljajo statistično pomembnega napovednega kazalca za SVR. Okužba z genotipom 3 ($p<0,001$), starost bolnika ≤ 40 let ob pričetku zdravljenja ($p<0,001$), jetrna steatoza $<5\%$ ($p=0,01$) in nizko izhodiščno (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml) virusno breme ($p<0,001$) pa so statistično značilno pomembni napovedni kazalci za SVR.

Rezultati multivariatne analize so predstavljeni v preglednici 11.

Preglednica 11: Multivariatna analiza dejavnikov, ki vplivajo na trajni virološki odziv.

Table 11: Results of multivariate logistic regression in predicting the sustained virological response.

Kategorialna spremenljivka	Multivariatna analiza OR (95% CI)	p-vrednost
Genotip 1	13,7 (2,7; 70,1)	< 0,001
Kontrolna skupina	1,8 (0,4; 8)	0,46
Starost nad 40 let	36,4 (7,3; 180,6)	< 0,001
Stadij fibroze (0-1)	0,8 (0,2; 3,1)	0,75
BMI (≤ 30)	1,6 (0,04; 65,7)	0,81
Jetрна steatoza ($<5\%$)	0,2 (0,04; 0,7)	0,01
HCV RNK (≤ 400.000)	0,04 (0,01; 0,3)	< 0,001

BMI: indeks telesne mase; CI: interval zaupanja; HCV: virus hepatitisa C; OR: razmerja obetov; RNK: ribonukleinska kislina

4.2.3 Ponovitev bolezni pri preiskovani in kontrolni skupini

Ponovitev bolezni (relaps) je opredeljena kot prisotnost virusnega bremena (HCV RNK) v krvi 24-tednov po zaključenem zdravljenju pri bolnikih, ki ob zaključku zdravljenja niso imeli zaznane plazemske viremije HCV RNK (EASL, 2014).

Opravili smo analizo ponovitve bolezni pri bolnikih v preiskovani in kontrolni skupini glede na vrsto genotipa HCV in izhodiščno plazemsko viremijo. V analizo smo vključili tiste bolnike, ki so imeli nezaznavno plazemsko viremijo ob zaključenem zdravljenju, kar pomeni, da so dosegli ETR.

Od skupno 162 vključenih bolnikov je prišlo do ponovitve bolezni pri 16 bolnikih (10 %).

Pri bolnikih z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml) je prišlo do ponovitve bolezni pri enem bolniku v kontrolni skupini (4 %), medtem ko v preiskovani skupini ponovitve nismo zaznali. Razlika med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,492$)

Pri bolnikih z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml) je prišlo do ponovitve bolezni pri enem bolniku (5 %) v preiskovani skupini in pri devetih bolnikih (41 %) v kontrolni skupini. Razlika med preiskovanci in kontrolami v pojavnosti ponovitve bolezni je bila statistično značilna ($p=0,004$).

Pri bolnikih z genotipom 3 smo ponovitev bolezni zaznali le pri tistih z visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml). Do ponovitve je prišlo pri dveh bolnikih v preiskovani skupini (7 %) in pri treh (10 %) bolnikih v kontrolni skupini. Razlika med ni bila statistično značilna ($p=0,758$).

Preglednici 12 in 13 podrobneje prikazujeta ponovitev bolezni glede na izhodiščno plazemsko viremijo v preiskovani in kontrolni skupini pri okuženih z genotipom 1 in genotipom 3.

Selič Kurinčič T. Vpliv fluvastatina na učinkovitost zdravljenja kroničnega hepatitisa C s pegiliranim interferonom α in ribavirinom.

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2014

Preglednica 12: Ponovitev bolezni pri bolnikih z genotipom 1 v preiskovani in kontrolni skupini glede na izhodiščno plazemsko viremijo

Table 12: Viral relapse rate in the fluvastatin and the control group with hepatitis C virus genotype 1 according to baseline viral load.

Genotip	Relaps	HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml			HCV RNK > 400.000 IU/ml		
		Preiskovanci	Kontrole	p-vrednost	Preiskovanci	Kontrole	p-vrednost
		N=6 n (%)	N=23 n (%)		N=20 n (%)	N=22 n (%)	
1	Da	0 (0)	1 (4)		1 (5)	9 (41)	
	Ne	6 (100)	22 (96)	0,492	19 (95)	13 (59)	0,004

HCV: virus hepatitisa C; RNK: ribonukleinska kislina

Preglednica 13: Ponovitev bolezni pri bolnikih z genotipom 3 v preiskovani in kontrolni skupini glede na izhodiščno plazemsko viremijo

Table 13: Viral relapse rate in the fluvastatin and the control group with hepatitis C virus genotype 3 according to baseline viral load.

Genotip	Relaps	HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml			HCV RNK > 400.000 IU/ml		
		Preiskovanci	Kontrole	p-vrednost	Preiskovanci	Kontrole	p-vrednost
		N=11 n (%)	N=22 n (%)		N=27 n (%)	N=31 n (%)	
3	Da	0 (0)	0 (0)		2 (7)	3 (10)	
	Ne	11 (100)	22 (100)	0.363	25 (93)	28 (90)	0.758

HCV: virus hepatitisa C; RNK: ribonukleinska kislina

4.3 STRANSKI UČINKI ZDRAVLJENJA PRI BOLNIKI V PREISKOVANI IN KONTROLNI SKUPINI

Med zdravljenjem je večina bolnikov preiskovane in kontrolne skupine navajala le blažje stranske učinke, ki niso zahtevali dodatnega farmakološkega zdravljenja oz. drugačnega ukrepanja. Najpogostejši stranski učinek je bila utrujenost, ki jo je navajala skoraj polovica bolnikov tako v preiskovani kot kontrolni skupini.

Od psihiatričnih stranskih učinkov sta se najpogosteje pojavljali depresija in anksioznost; le po eden bolnik iz preiskovane in kontrolne skupine je zaradi hudih psihiatričnih težav potreboval hospitalizacijo v specialistični ustanovi. Pri 16 % preiskovancev in pri 17 % bolnikov v kontrolni skupini je bilo potrebno zdravljenje z antidepressivi.

Med dermatološkimi stranskimi učinki je bila najbolj moteče izpadanje las, ki se je pojavilo kar pri 14 % bolnikov v preiskovani skupini in 10 % bolnikov v kontrolni skupini.

Hipotireoza se je razvila pri dveh (3%) bolnikih v preiskovani skupini in dveh (2%) bolnikih v kontrolni skupini, medtem ko je do hipertireoze prišlo pri treh (4,7%) preiskovancev in dveh (2%) kontrolah. Razlika med pojavnostjo hipotireoze in hipertireoze ni dosegla statistično pomembne razlike med preiskovanci in kontrolami ($p=0,39$).

Med zdravljenjem smo pri enem (1,6 %) bolniku iz preiskovane skupine z genotipom 1 morali prekiniti zdravljenje s FLU zaradi pomembnega zvišanja GGT po petih mesecih, vendar je bolnik poleg FLU prejemal tudi druga hepatotoksična zdravila. Pri ostalih preiskovancih zdravljenja nismo predčasno prekinjali zaradi stranskih učinkov zdravil, kakor tudi ne zaradi drugih razlogov.

Podrobneje so stranski učinki zdravljenjem pri bolnikih v preiskovani in kontrolni skupini predstavljeni v preglednici 14.

Preglednica 14: Stranski učinki zdravljenja preiskovane in kontrolne skupine.

Table 14: Side effect of treatment in the fluvastatin and the control group.

Stranski učinki	Preiskovana skupina	Kontrolna skupina
	N=64 n (%)	N=98 n (%)
Lokalna reakcija po podkožni injekciji	6 (9)	1 (1)
Utrujenost	30 (47)	49 (50)
Glavobol	7 (11)	13 (13)
Vročina	8 (13)	8 (8)
Bolečine v mišicah	10 (16)	13 (13)
Bolečine v sklepih	10 (16)	8 (8)
Siljenje na bruhanje	3 (5)	2 (2)
Izguba teka	9 (14)	3 (3)
Izguba telesne teže	10 (16)	19 (19)
Motnje razpoloženja		
Depresija	12 (19)	15 (15)
Anksioznost	8 (13)	13 (13)
Nespečnost	6 (9)	5 (5)
Kožne spremembe		
Srbečica kože	8 (13)	7 (7)
Izpadanje las	9 (14)	10 (10)
Dermatitis	7 (11)	5 (5)
Motnje v delovanju ščitnice		
Hipotireoza	2 (3)	2 (2)
Hipertireoza	3 (5)	2 (2)

V preiskovani skupini smo pri osmih (12,5 %) bolnikih morali zaradi anemije (Hb pod 100 g/l) znižati odmerek RBV, medtem ko smo v kontrolni skupini le-tega znižali pri štirih (4 %) bolnikih. Razlika med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,06$).

Štirje (6 %) bolniki v preiskovani skupini in trije (3 %) bolniki v kontrolni skupini so zaradi anemije potrebovali eritropoetin; razlika med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,36$).

Granulocitne kolonije stimulirajoči faktor je zaradi kritične nevtropenije prejemal en (1,6 %) bolnik v preiskovani skupini in štirje (4 %) bolniki v kontrolni skupini, kar ne predstavlja statistično značilne razlike med skupinama ($p=0,42$).

V preglednici 15 so predstavljeni hematološki stranski učinki zdravljenja.

Preglednica 15: Hematološki stranski učinki zdravljenja pri preiskovani in kontrolni skupini.

Table 15: Haematological side effects of treatment in the fluvastatin and control groups.

Hematološki stranski učinki zdravljenja	Preiskovana skupina N=64 n (%)	Kontrolna skupina N=98 n (%)
Levkopenija		
Levkociti $<4.000/\text{mm}^3$	11 (17)	22 (22)
Nevtropenija $500-750/\text{mm}^3$	3 (5)	0 (0)
Anemija		
Hemoglobin ≤ 100 g/l	7 (11)	10 (10)
Trombocitopenija		
Trombociti $<140.000/\text{mm}^3$	9 (14)	13 (13)

5 RAZPRAVA

Kronični hepatitis C ostaja pomemben svetovni javno zdravstveni problem. Ker kronična okužba lahko več let, tudi desetletji, poteka klinično nemo, je za njeno odkrivanje pomembno aktivno iskanje okuženih, predvsem med izpostavljeni skupinami. Hitro odkrivanje okužbe v zgodnejšem poteku bolezni je izrednega pomena, saj klinične raziskave kažejo, da je uspešnost zdravljenja s trenutno uveljavljeno kombinacijo PEG-IFN α in RBV uspešnejše pri bolnikih, mlajših od 40 let in tistih, ki še nimajo napredovale jetrne bolezni (EASL, 2014; Ghany in sod., 2009).

Trenutno je zdravljenje CHC eno izmed najučinkovitejših protivirusnih zdravljenj, saj SVR pri več kot 99 % bolnikov predstavlja trajno ozdravitev (EASL, 2014; Giannini in sod., 2010; Swain in sod., 2010). Kljub zelo učinkovitemu protivirusnemu zdravljenju pa obstajajo pomembne razlike med bolniki, okuženimi z različnimi genotipi. Mednarodne raziskave kažejo, da s kombinacijo PEG-IFN α in RBV ozdravimo 42 do 52 % bolnikov z genotipom HCV 1, 66 do 79 % bolnikov z genotipom HCV 3 in kar do 95 % bolnikov z genotipom HCV 2 (Fried in sod., 2002; Hadziyannis in sod., 2004; Manns in sod., 2001; Shiffman in sod., 2007; Zeuzem in sod., 2004). Pri bolnikih okuženih z genotipom HCV 4, ki jih je v Sloveniji izredno malo, je zdravljenje učinkovito pri 43 do 68 % (Esmat in sod., 2012). Z uvedbo protezanih inhibitorjev se je izboljšal SVR pri bolnikih z genotipom HCV 1, saj je zdravljenje pri naivnih bolnikih uspešno pri 67 do 75 %, vendar so ob tretirnem zdravljenju pogostejši stranski učinki, ki zahtevajo tudi dodatne farmakološke ukrepe (Jacobson in sod., 2011; Poordard in sod., 2011).

Po nam dostopnih podatkih iz strokovnega slovstva je naša raziskava prva na svetu, v kateri smo raziskovali vpliv dodanega FLU kombinaciji PEG-IFN α in RBV na učinkovitost zdravljenja CHC pri bolnikih z genotipom HCV 3. Ob zasnovi naše raziskave v začetku leta 2008 po nam znanih podatkih tudi ni bilo objavljenih raziskav o vplivu dodanega FLU kombinaciji PEG-IFN α in RBV na SVR pri bolnikih z genotipom HCV 1.

Na temelju objavljenih raziskav *in vitro* in kliničnih raziskav o učinku monoterapije s statini pri bolnikih s CHC smo konec leta 2008 zasnovali biomedicinsko raziskavo in februarja 2009 zaprosili za mnenje o njeni etični neoporečnosti. Odobritev s strani

Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko smo prejeli konec maja 2009.

Temelj zasnove naše raziskave je bila objava izsledkov raziskave *in vitro* o zaviralnem učinku lovastatina na pomnoževanje HCV, v kateri so dokazali, da HCV pri pomnoževanju potrebuje celični geranilgeranilpirofosfat, ki nastaja v sintezni poti holesterola v hepatocitu (Ye in sod., 2003). Leta 2005 je Wang s sod. (2005) pojasnil mehanizem zaviralnega učinka statinov v poteku življenjskega kroga HCV. Ugotovili so, da virusna beljakovina NS5A tvori replikacijski kompleks le s prenilirano celično beljakovino, ki so jo poimenovali FBL2. Darovalec prenilne skupine pa je celični geranilgeranilpirofosfat, ki nastaja pri sintezi holesterola v hepatocitih. Leta 2006 je Ikeda s sod. (2006) objavil izsledke raziskave *in vitro*, kjer so najmočnejšo protivirusno aktivnost med statini zaznali pri FLU ter potrdili sinergistični učinek delovanja statinov v kombinaciji z IFN α , kar je odprlo možnosti za opravljanje kliničnih raziskav (Ikeda in Kato., 2007). Na temelju objavljenih raziskav smo se odločili, da bodo bolniki v naši raziskavi prejeli poleg kombinacije PEG-IFN α in RBV dodatno še FLU in ne drugih vrst statinov.

Velikost dnevnega odmerka FLU, ki smo ga uporabili v naši raziskavi, je temeljila na prvi objavljeni klinični raziskavi o učinku monoterapije s FLU pri bolnikih s CHC, v kateri so preiskovanci prejeli FLU v dnevnem odmerku od 20 do 320 mg do največ 12 tednov (Bader in sod., 2008). Pri polovici bolnikov, ki so prejeli FLU 80 mg ali manj, je prišlo do zmanjšanja plazemske viremije HCV RNK. Kar pri 82 % se je plazemska viremija zmanjšala v prvih štirih tednih po uvedbi zdravljenja, vendar je bilo zmanjšanje virusnega bremena v večini primerov le prehodno in je trajalo od dveh do petih tednov. Pomembnih stranskih učinkov zdravljenja pri bolnikih niso opazili. Podobne izsledke raziskav je leta 2009 opisal tudi Mihailă s sod. (2009), saj je pri bolnikih s CHC potrdil učinek FLU v odmerku 40 mg dnevno na zmanjšanje plazemske viremije HCV RNK kot tudi na zmanjšanje ravni številnih citokinov. Kljub temu, da je raziskava Baderja s sod. (2008) pokazala največjo učinkovitost zmanjšanja plazemske viremije pri uporabi FLU v odmerku 20 mg dnevno, smo se odločili, da v naši raziskavi bolniki prejemo najvišji dovoljen dnevni odmerek FLU, kar je 80 mg dnevno. Glavni razlog za to odločitev je bil, da v literaturi nismo zasledili raziskave, ki bi ugotavljala koncentracijo statinov v hepatocitih glede na njihovo koncentracijo v plazmi. Poleg tega so v kliničnih raziskavah bolniki s

hiperholesterolemijo, ki so prejeli FLU v odmerku 80 mg dnevno, dosegli serumsko koncentracijo FLU do največ 61 ng/ml, medtem ko so se v raziskavah *in vitro* koncentracije FLU, ki so zavirale pomnoževanje HCV, gibale med 389 in 2000 ng/ml, kar je občutno več kot lahko dosežemo pri bolnikih z običajnimi odmerki učinkovine (Ikeda in sod., 2006; Sabia in sod., 2001). Dodaten razlog za to odločitev pa je bil, da je zdravilo FLU 80 mg dnevno edina oblika peroralnega zdravljenja s tako imenovanim podaljšanim sproščanjem, ki zagotavlja 8 do 12 urno linearno sproščanje zdravila.

Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije je bilo v Sloveniji v zadnjem desetletju vsako leto na novo prijavljenih od 80 do 140 oseb, kronično okuženih s HCV (Klavs in Kustec, 2012). Na temelju epidemioloških podatkov in statističnega izračuna, da potrebujemo v preiskovani skupini najmanj 70 bolnikov, smo se odločili za kontrolno historično skupino. To odločitev smo lahko sprejeli tudi zato, ker v Sloveniji bolnike s CHC že od leta 1997 dalje zdravimo po enotnih nacionalnih smernicah, ki jih glede na nova dognanja vedno posodabljam (Matičič in sod., 1999). Smernice natančno določajo potrebne ukrepe pred uvedbo zdravljenja, odmerjanje zdravil in čas trajanja zdravljenja, kot tudi njegovo biokemično in virološko spremljanje (EASL, 2014; Matičič in Kastelic, 2009). Algoritem zdravljenja bolnikov s CHC predstavlja enega izmed najbolj natančno izdelanih potekov zdravljenja kronične bolezni v infektologiji. Zelo pomembna je virološka diagnostika, saj se na temelju plazemske viremije odločamo tako o trajanju zdravljenja, kot o njegovi predčasni prekinitvi. Izrednega pomena pa je jasno opredeljena uspešnost zdravljenja, saj SVR v več kot 99 % predstavlja trajno ozdravitev (Giannini sod., 2010; Swain in sod., 2010). In prav zaradi teh dejstev smo lahko prospektivno preiskovano skupino, ki je bila izpostavljena intervenciji, primerjali s kontrolno historično skupino, saj so bili bolniki v obeh skupinah obravnavani enako, torej v skladu z evropskimi oz. nacionalnimi smernicami (EASL, 2014; Matičič in Kastelic, 2009).

Ker so bili bolniki v preiskovani skupini izpostavljeni intervenciji in so prejeli dodatno zdravilo, ki je registrirano za zdravljenje hiperlipidemije in ne za zdravljenje CHC, je vključevanje zadostnega števila bolnikov potekalo 17 mesecev. Tako smo v preiskovano skupino vključili 81 bolnikov, vendar je zdravljenje in 24-tedensko opazovalno obdobje zaključilo le 64 bolnikov, kar predstavlja 79 %. Odstotek bolnikov, ki je zaključil

zdravljenje in šest mesečno opazovalno obdobje, je primerljiv s tujimi raziskavami, kjer se giblje med 77 in 90 %, kot tudi s slovensko raziskavo iz leta 2002, kjer je zdravljenje in opazovalno obdobje zaključilo 86 % bolnikov (Brinovec in sod., 2002; Zeuzem in sod., 2000, 2004, 2006). Največ bolnikov v preiskovani skupini je samovoljno prekinilo zdravljenje ali pa se po zdravljenju ni zglasilo na predviden kontrolni pregled in tako nismo mogli podati dokočnega mnenja glede uspešnosti zdravljenja. Slaba predanost zdravljenju je bila tako v naši raziskavi 14,8 %, kar je primerljivo s podatki raziskave, ki je bila opravljena pri bolniki s CHC v Celju in je znašala 18 % (Selič Kurinčič in sod., 2012). Ostali vzroki za izključitev bolnikov iz raziskave so bili redkejši. Pri eni bolnici (1,2 %), ki je že pred uvedbo zdravljenja imela kompenzirano jetrno cirozo, smo predčasno prekinili zdravljenje zaradi jetrne dekompenzacije, kar je znan neželeni učinek terapije in se v ostalih kliničnih raziskavah pojavlja celo pri do 37 % bolnikov z jetrno cirozo (Dultz in sod., 2013). Pri enem bolniku (1,2 %) smo ukinili zdravljenje zaradi pomembnega porasta ravni GGT, vendar je bolnik prejemal več različnih hepatotoksičnih učinkovin, zato porasta ravni GGT ne moremo vzročno opredeliti. Trije bolniki (3,7 %) so predčasno prekinili zdravljenje zaradi neželenih stranskih učinkov (bolečine v mišicah, sklepah). Tudi ti rezultati so primerljivi s slovenskimi raziskavami, kjer je od 4 do 8 % bolnikov predčasno prekinilo zdravljenje zaradi njegovih stranskih učinkov (Brinovec in sod., 2002; Selič Kurinčič in sod., 2012).

Glede na zasnovo raziskave, ki je vključevala historično kontrolno skupino bolnikov, z zaključenim zdravljenjem in 24-tedenskim opazovalnim obdobjem, smo zaradi ustrezne primerljivosti iz preiskovane skupine izključili vse, ki zdravljenja in opazovalnega obdobja niso zaključili. Najprej smo opravili analizo najpomembnejših bolnikovih dejavnikov uspešnosti zdravljenja, saj obsežne klinične raziskave kažejo, da starost ≤ 40 let, BMI ≤ 30 kg/m² in nenapredovala jetrna bolezen pripomorejo k učinkovitejšemu zdravljenju. Eden najpomembnejših napovednih kazalcev SVR je genomska varianta CC IL28B, vendar ob zasnovi naše raziskave te preiskave še nismo rutinsko opravljali, zato je nismo vključili med osnovne značilnosti bolnikov (Bressler in sod., 2003; Darling in Fried, 2006; EASL, 2014; Ge in sod., 2009; Shi in sod., 2012).

V naši raziskavi je bilo skupno kar 79 % vseh bolnikov starih ≤ 40 let, kar predstavlja

ugoden napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja. V preiskovani skupini je bilo starih ≤ 40 let 87,5 % in v kontrolni skupini 73,5 %, kar je v skladu z rezultati slovenske raziskave pri uživalcih nedovoljenih drog, kjer je bil delež starih ≤ 40 let od 87,2 do 93,8 % (Matičič in sod., 2013). Dodaten ugoden napovedni kazalec uspešnosti zdravljenja v naši raziskavi je bil tudi delež bolnikov z BMI ≤ 30 kg/m². Skupno smo ugotavljali BMI ≤ 30 kg/m² kar pri 95 % vseh bolnikov. Obsežne klinične raziskave kažejo, da imajo bolniki z BMI > 30 kg/m² kar 80 % manjšo možnost za SVR kot bolniki z BMI ≤ 30 kg/m², zato je zmanjšanje prekomerne telesne teže pred uvedbo zdravljenja zelo pomembna. Poleg tega pa BMI vpliva tudi na razvoj jetrne steatoze in fibroze (Bressler in sod., 2003; Hourigan in sod., 1999; Leandro in sod., 2006).

Zelo pomemben neodvisen napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja je tudi stadij jetrne fibroze, saj raziskave kažejo, da bolniki z napredovalo jetrno boleznijo (premostitvena fibroza, ciroza) dosegajo statistično značilno slabši SVR kot bolniki z začetnimi nenormalnostmi jetrnega tkiva (Fried in sod., 2002; Manns in sod., 2001). V naši raziskavi je večina bolnikov (90 %), pri katerih smo opravili jetrno biopsijo, imela minimalne do blage spremembe jetrnega tkiva (METAVIR ≤ 2), kar predstavlja pomemben napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja. Glede na nacionalne smernice v Sloveniji bolnike z blago do zmerno fibrozo jetrnega tkiva zdravimo individualno glede na značilnosti posameznika (Matičič in Kastelic, 2009). Raziskave so pokazale, da je pri teh bolnikih SVR pogostejši (Fried in sod., 2002; Manns in sod., 2001; Shiffman in sod., 2007). Delež zdravljenih bolnikov s takimi patohistološkimi spremembami se sklada tudi z deležem bolnikov, zdravljenih v Sloveniji v začetku tisočletja (Brinovec in sod., 2002, 2004). Patohistološki pregled jetrnega tkiva daje naši raziskavi še dodaten pomen, saj v nobeni od objavljenih raziskav o vplivu FLU v kombinaciji PEG-IFN α in RBV na SVR pri bolnikih okuženih z genotipom HCV 1 brez sočasne okužbe s HIV ni podatka o rezultatih jetrne biopsije (Georgescu in sod., 2011; Kondo in sod., 2012; Sezaki in sod., 2009)

Opravili smo tudi analizo izhodiščnih vrednosti LDL-holesterola in trigliceridov, saj obsežne klinične raziskave kažejo, da zvečana raven LDL-holesterola in trigliceridov v serumu predstavljata neodvisna napovedna dejavnika za uspešnost zdravljenja (Gopal in sod., 2006; Harrison in sod., 2010; Ramcharran in sod., 2010). V naši raziskavi so imeli

bolniki v preiskovani in kontrolni skupini ravni LDL-holesterola v normalnem območju kar v 56 do 62 % in normalne ravni trigliceridov v 78 do 81 %. Med preiskovano in kontrolno skupino nismo ugotovili statistično značilnih razlik glede starosti, BMI, steatoze, fibroze, ravni LDL-holesterola in trigliceridov v serumu, kar vse bi lahko vplivalo na učinkovitost zdravljenja.

Od virusnih dejavnikov, ki vplivajo na uspešnosti zdravljenja, smo analizirali porazdelitev HCV genotipa in izhodiščno plazemsko viremijo. Obsežne klinične raziskave kažejo, da je zdravljenje bolnikov z genotipom 3 uspešnejše v primerjavi z genotipom 1, prav tako je zdravljenje učinkovitejše pri bolnikih z nizko izhodiščno plazemsko viremijo (Manns in sod., 2006; Shiffman in sod., 2007; von Wagner in sod., 2005; Zeuzem in sod., 2006). V celotni populaciji bolnikov je prevladovala okužba z genotipom 3 (56 %), ki je bila med preiskovano (59 %) in kontrolno (54 %) skupino enakomerno porazdeljena, statistične razlike med porazdelitvijo HCV genotipov nismo ugotovili. Tvrstni rezultati niso povsem v skladu z epidemiološkimi podatki porazdelitve genotipov HCV v Sloveniji, saj pri nas, tako kot drugje v Evropi, prevladuje okužba z genotipom 1 (56 %), sledi ji okužba z genotipom 3 (37,8 %) (Seme in sod., 2009). Razliko v porazdeljenosti genotipov med zdravljenimi bolniki in vsemi znanimi okuženimi v Sloveniji je moč razložiti s tem, da so v raziskavi preiskovane skupine okuženih s HCV v Sloveniji Semetove s sod. (2009) uživalci nedovoljenih drog predstavljali 34,3 %, v naši raziskavi zdravljenih bolnikov pa je bil ta delež precej večji (77 %). Semetova s sod. (2009) je ugotovila, da je uživanje nedovoljenih drog statistično značilno povezan z okužbo z genotipom 3 ($p < 0,0001$).

Raziskave kažejo, da je zdravljenje učinkovitejše pri bolnikih z nizko izhodiščno plazemsko viremijo. Razmejitev med nizko in visoko plazemsko viremijo se v literaturi med posameznimi avtorji razlikuje. Evropske smernice postavljajo to mejo med 400.000 in 800.000 IU/ml HCV RNK, japonske smernice pa so mejo postavili celo pri 100.000 IU/ml (EASL, 2014; Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines, 2013; Zeuzem in sod., 2009). Glede na to, da razmejitev med nizko in visoko viremijo ni jasno opredeljena, smo se v naši raziskavi odločili za razmejitev pri 400.000 IU/ml, saj raziskave kažejo, da bolniki z genotipom 1 in izhodiščno plazemsko viremijo pod 400.000 IU/ml dosegajo statistično značilno boljše uspehe zdravljenja kot bolniki z HCV RNK nad 400.000 IU/ml

(Berg in sod., 2006; Martinot-Peignoux in sod., 2006; Zehnter in sod., 2006; Zeuzem in sod., 2009, 2012). Pri bolnikih z genotipom 3 se razmejitev med nizko in visoko viremijo, ki vpliva na SVR, med posameznimi avtorji razlikuje in se giba med 400.000 do 800.000 IU/ml (Manns in sod., 2011; Shiffman in sod., 2007; von Wagner in sod., 2005; Zeuzem in sod., 2004). V naši raziskavi smo ugotovili v preiskovani skupini statistično značilno višje izhodiščno virusno breme v primerjavi s kontrolami, tako glede absolutnih vrednosti kot glede na delež bolnikov z nizko oz. visoko viremijo ($p=0,01$), kar bi lahko predstavljalo neugoden napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja preiskovane skupine v primerjavi s kontrolno skupino.

Po opravljeni analizi virusnih in bolnikovih napovednih dejavnikov uspešnosti zdravljenja, smo sprva opravili statistično analizo viroloških odzivov v posameznih obdobjih med zdravljenjem in po njegovem zaključku ne glede na izhodiščno plazemsko viremijo.

Bolniki v preiskovani skupini z genotipom 3 so dosegli RVR v 89 %, EVR v 100 % in ETR v 100 %, v kontrolni skupini so bili RVR 92 %, EVR 100 % in ETR 98 %. Med obema skupinama ni bilo statistično značilne razlike med RVR ($p=0,623$), EVR ($p=0,297$) in ETR ($p=0,297$). Trajni virološki odziv so v preiskovani skupini dosegli v 95 %, medtem ko so v kontrolni skupini dosegli SVR v 92 %, razlika med skupinama tudi med SVR ni bila statistično značilna ($p=0,661$). V primerjavi z uspešnostjo zdravljenja naivnih bolnikov z genotipom 3 v objavljenih kliničnih raziskavah, ugotavljamo, da naši bolniki dosegajo tako virološke odzive med in ob zaključku zdravljenja kot tudi SVR v bistveno višjih deležih kot to navaja svetovna literatura, kjer je RVR med 59 in 75 %, EVR med 85 in 95 %, ETR med 76 in 94 % ter SVR med 66 in 84 % (Fried in sod., 2002; Hadziyannis in sod., 2004; Mangia in sod., 2005; Manns in sod., 2001; Shiffman in sod., 2007; Zeuzem in sod., 2004).

Bolniki v preiskovani skupini z genotipom 1 so dosegli RVR v 35 %, EVR v 92 % in ETR v 85 %, v kontrolni skupini so bili RVR 42 %, EVR 93 % in ETR 87 %. Med skupinama ni bilo statistično značilne razlike med RVR ($p=0,526$), EVR ($p=0,781$) in ETR ($p=0,842$). Prav tako nismo ugotavljali statistično značilne razlike med SVR ($p=0,138$). Bolniki z genotipom 1 v preiskovani skupini so dosegli SVR v 81 %, medtem ko so v kontrolni skupini dosegli SVR v 64 %. V kolikor primerjamo uspešnost zdravljenja bolnikov iz naše

raziskave z objavljenimi kliničnimi raziskavami, ugotavljamo, da naši bolniki dosegajo virološke odzive med in ob zaključku zdravljenja kot tudi SVR v bistveno višjih delež kot to navaja svetovna literatura, kjer je RVR med 16 in 47 %, EVR med 26 in 62 %, ETR med 59 in 78 % ter SVR med 42 in 52 % (Fried in sod., 2002, 2011; Hadziyannis in sod., 2004; Jensen in sod., 2006; Manns in sod., 2001; Zeuzem in sod., 2006).

Glede na objavljene rezultate preteklih slovenskih raziskav ugotavljamo, da se je uspešnost zdravljenja s kombinacijo PEG-IFN α in RBV tekom let zvečala za 20 % pri bolnikih z genotipom 1, medtem ko beležimo pri bolnikih z genotipom 3 v Sloveniji že od leta 1997 SVR nad 85 % (Brinovec in sod., 2002, 2004; Matičič in sod., 2004, 2013).

Nato je sledila analiza uspešnosti zdravljenja glede na višino izhodiščne plazemske viremije. Pri bolnikih z genotipom 3 med preiskovano in kontrolno skupino nismo ugotovili statistično značilne razlike med virološkimi odzivi v posameznih obdobjih med zdravljenjem, prav tako ni bilo razlike med SVR pri bolnikih z nizko ($p=0,363$) in visoko plazemsko viremijo ($p=0,758$).

Nekoliko drugačne izsledke analize smo dobili pri bolnikih z genotipom 1. Med preiskovano in kontrolno skupino nismo ugotovili statistično značilne razlike med virološkimi odzivi med zdravljenjem glede na višino izhodiščne plazemske viremije, prav tako ni bilo razlike med SVR pri bolnikih z nizko plazemsko viremijo ($p=0,224$).

Pri bolnikih z visoko izhodiščno plazemsko viremijo pa je dodatek FLU izboljšal uspešnost zdravljenja. Bolniki v preiskovani skupini so tako dosegli SVR v 75 % in v kontrolni skupini v 41 %, kar predstavlja statistično značilno razliko ($p=0,024$). Na temelju tovrstne analize lahko zaključimo, da dodatek FLU bolnikom z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo, ki je po naši opredelitvi pri HCV RNK nad 400.000 IU/ml, statistično značilno izboljša SVR, kar je eden od pglavitnih ciljev zdravljenja CHC.

Podobne izsledke raziskav so objavili še nekateri drugi raziskovalci. Maja leta 2009 je Sezaki s sod. (2009) prvi objavil rezultate klinične raziskave, ki je bila podobno zasnovana kot naša. Ključna razlika med obema raziskavama je bila v odmerku FLU, saj so bolniki v naši raziskavi prejeli FLU 80 mg dnevno, medtem ko v raziskavi Sezakija s sod. (2009)

prejemali odmerke 20 mg dnevno. Poleg tega je japonska raziskava vključevala le bolnike, okužene s HCV genotipom 1 in visoko plazemsko viremijo, definirano pri HCV RNK nad 100.000 IU/ml (Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines, 2013). V raziskavi je sodelovalo 19 bolnikov s CHC genotipom 1, ki so 48 tednov prejeli kombinacijo SOC in FLU 20 mg dnevno. Kar 67 % bolnikov je doseglo SVR. Zaključkov o morebitni statistično pomembni učinkovitosti zdravljenja z dodatkom FLU niso podali, saj raziskava ni vključevala kontrolne skupine bolnikov.

Izsledke podobno zasnovane raziskave, v kateri so naivni bolniki s CHC genotipom 1 prejeli SOC in FLU 20 mg dnevno, je leta 2011 objavil Georgescu s sod. (2011). Glavna razlika od predhodno opisane je bila, da je bila slednja zasnovana kot dvojno slepa in je vključevala večje število bolnikov, vendar ni posebej opredeljevala razmejitev med nizko in visoko izhodiščno plazemsko viremijo. Vključenih je bilo 209 naivnih bolnikov s CHC genotipom 1. Polovica bolnikov je 48 tednov prejela SOC, druga skupina je enako obdobje prejela SOC in FLU 20 mg dnevno. Bolniki, ki so prejeli dodatno FLU so v 75,96 % dosegli EVR, medtem ko so bolniki v kontrolni skupini EVR dosegli v 61,9 %, kar je statistično značilna razlika ($p=0,041$). Uspešnost zdravljenja je bila v skupini FLU 63,46 %, medtem ko v kontrolni skupini 49,52 %, kar predstavlja statistično značilno izboljšanje SVR pri preiskovancih ($p=0,05$). V kolikor primerjamo izsledke naše raziskave in raziskave Georgescuja s sod. (2011) ugotovimo, da slovenski bolniki z genotipom 1, ne glede na višino izhodiščne plazemske viremije, z dodatkom FLU k SOC niso dosegli statistično značilnega izboljšanja EVR ($p=0,781$) niti SVR ($p=0,138$). V primerjavi z raziskavo Georgescuja s sod. (2011) je večji delež naših preiskovancev dosegel SVR (63,46 vs. 81 %); zanimiva pa je primerjava z Georgescujevimi kontrolami, saj je SVR tudi pri naših kontrolah večji (49,52 vs. 64 %), kar je najverjetneje tudi odraz razlik v osnovnih značilnostih bolnikov. V raziskavi Georgescuja s sod. (2011) je bila mediana starost bolnikov 43 let, medtem ko v naši raziskavi 35 let, ostalih napovednih dejavnikov SVR (izhodiščna plazemska viremija, stadij jetrne fibroze) zaradi pomanjkljivih podatkov omenjene raziskave nismo mogli opravičiti.

Rezultate nam primerljive raziskave je leta 2012 objavil Kondo s sod. (2012), ki je vključil le bolnike z genotipom 1 in visoko plazemsko viremijo. Od naše raziskave se je razlikovala

po tem, da so vključili tako naivne kot predhodno že zdravljenje bolnike. Bolniki v preiskovani skupini so prejeli FLU 20 mg dnevno in SOC, v kontrolni skupini pa le SOC. Trajni virološki odziv so preiskovanci dosegli skupno v 63 %, kontrole pa v 41,7 %, kar predstavlja statistično značilno razliko ($p=0,0422$). Poleg tega so ugotovili, da so bolniki v preiskovani skupini, ki so bili predhodno že zdravljeni, dosegli višji SVR (88,9 %) v primerjavi s predhodno zdravljenimi bolniki, ki FLU niso prejeli (29,4 %), kar predstavlja statistično značilno razliko ($p=0,0112$). Pri naivnih bolnikih dodatek FLU ni statistično značilno vplival na SVR, kar je poglavitna razlika med japonsko in našo raziskavo. Izsledke naše raziskave pa potrjujejo dognanja Georgescuja s sod. (2011), ki je dokazal statistično značilen vpliv FLU na SVR pri naivnih bolnikih z genotipom HCV 1. Kljub omenjenim razlikam pa izsledki vseh treh raziskav kažejo, da dodatek FLU statistično značilno izboljša SVR pri naivnih in predhodno že zdravljenih bolnikih z genotipom 1 (Georgescu in sod., 2011; Kondo in sod., 2012; Selič Kurinčič in sod., 2014).

Prvo raziskavo o vplivu dodanega FLU 80 mg dnevno kombinaciji PEG-IFN α in RBV je objavila Milazzo s sod. (2010), vendar je vključila le bolniki z genotipom HCV 1, sočasno okužene s HIV. Večina bolnikov je imela visoko plazemsko viremijo, ki so jo opredelili pri HCV RNK >400.000 IU/ml. Ugotovili so, da kombinacija FLU80 mg dnevno in SOC ne izboljša SVR pri bolnikih, ki so sočasno okuženi s HIV in HCV, kar je najverjetneje posledica vpliva sookužbe s HIV. Tovrstno ugotovitev podpirajo tudi izsledki raziskav, ki kažejo, da je učinkovitost zdravljenja CHC s SOC pri sočasno okuženih s HIV precej slabša, saj okuženi z genotipom 1 dosegajo SVR le med 14 in 36 % (Chung in sod., 2004; Milazzo in sod., 2010; Sulkowski, 2008).

V primerjavi s SVR v obsežnih kliničnih raziskavah (genotip 1 od 42 do 52 %; genotip 3 od 66 do 79 %) lahko zelo visok SVR bolnikov v naši raziskavi tako v preiskovani (genotip 1 81 %; genotip 3 95 %) kot v kontrolni skupini (genotip 1 64 %, genotip 3 92 %) pojasnimo predvsem z ugodnimi napovednimi dejavniki uspeha zdravljenja tako s strani bolnika kot virusa. Ugotovili smo, da je doseglo v naši raziskavi SVR 93 % bolnikov z genotipom 3, v primerjavi z 70 % bolnikov z genotipom 1; 95 % bolnikov starih ≤ 40 let v primerjavi z 41 % starih >40 let; 89 % bolnikov z jetrno steatozo pod 5 % in 69 % s steatozo nad 5 %; 87 % bolnikov z blagimi spremembami jetrnega tkiva (METAVIR 0-1)

in 79 % z napredovalo jetrno boleznijo (METAVIR 2-4); 84 % bolnikov z BMI ≤ 30 kg/m² v primerjavi s 75 % bolnikov z BMI > 30 kg/m² in kar 94 % bolnikov z nizko izhodiščno plazemsko viremijo v primerjavi s 77 % bolnikov z visoko plazemsko viremijo. Izsledki naše raziskave so v skladu z mednarodnimi analizami, kjer so ugotovili, da uspešnost zdravljenja statistično značilno izboljšajo okužba z genotipom 3, nižja izhodiščna plazemska viremija, starost ≤ 40 let, jetrna steatozo pod 5 %, BMI ≤ 30 kg/m² in blage nenormalnosti jetrnega tkiva (Darling in Fried, 2006; EASL, 2014; Patton in sod., 2004; Shiffman in sod., 2007; Zeuzem in sod., 2004) .

Nato smo opravili bivariatno in multivariatno analizo najpomembnejših napovednih kazalcev uspešnosti zdravljenja. Zaradi relativno majhnega števila bolnikov v posameznih podskupinah, smo bili omejeni s številom napovednih kazalcev za logistično regresijo, kar je v skladu s splošnimi statističnimi pravili (Agresti, 2007). Bivariatna analiza je pokazala, da sta od bolnikovih dejavnikov starost bolnika ob pričetku zdravljenja ≤ 40 let ($p < 0,001$) in jetrna steatoza < 5 % ($p = 0,01$) statistično značilno pomembna napovedna kazalca za SVR. Od virusnih dejavnikov sta statistično značilno pomembna napovedna kazalca za SVR okužba z genotipom 3 ($p < 0,001$) in izhodiščni HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml ($p < 0,001$). Z multivariatno analizo smo prišli do podobnih ugotovitev, zaradi sovplivanja analiziranih dejavnikov so se med obema analizama razlikovala le razmerja obov. Z opravljeno logistično regresijo smo tako opredelili bolnikove in virusne dejavnike, ki statistično izboljšajo uspešnost zdravljenja. Vsi ti izsledki naše analize so v skladu številnimi objavljenimi kliničnimi raziskavami (Berg in sod., 2006; Darling in Fried, 2006; EASL, 2014; Martinot-Peignoux in sod., 2006; Shiffman in sod., 2007; Zeuzem in sod., 2004) .

Poleg ugodnih napovednih dejavnikov SVR je na dober uspeh zdravljenja bolnikov v naši raziskavi vplivala tudi optimizacija zdravljenja s SOC, tako v preiskovani kot kontrolni skupini. Optimizacija zdravljenja vključuje odmerjanje RBV glede na telesno težo bolnika tako pri genotipu 1 kot genotipu 3, trajanje zdravljenje glede na virološki odziv v posameznih obdobjih med zdravljenjem in agresivno farmakološko in nefarmakološko zdravljenje neželenih učinkov (EASL, 2014; Schaefer in sod., 2012; Thévenot in sod., 2007). Poleg tega so bili naši bolniki pod rednim nadzorom izkušenih specialistov za

zdravljenje virusnih hepatitisov in v primeru neželenih stranskih učinkov napoteni tudi k ustreznemu specialistu (psihiatru, dermatologu), dodatno usposobljenem za zdravljenje bolnikov s CHC. S tovrstno obravnavo lahko pomembno zmanjšamo predčasno prekinitev zdravljenja zaradi neželenih stranskih učinkov zdravil. Zelo pomemben vzrok uspešnega zdravljenja slovenskih bolnikov predstavlja tudi obravnava in vodenje od opioidov odvisnih uživalcev drog, ki se zdravijo zaradi CHC, saj od leta 2007 v Sloveniji obravnavamo bolnike v skladu z Nacionalnimi usmeritvami obvladovanja okužbe z virusom hepatitisa C pri uživalcih drog (Matičič in Kastelic, 2009). Tovrstne nacionalne usmeritve so nujne za dobro uspešnost zdravljenja CHC, saj so v naši raziskavi od opioidov odvisni uživalci drog predstavljali kar 77 % vseh bolnikov.

Dodatno smo pri naših bolnikih opravili tudi analizo ponovitve bolezni po zaključenem neuspešnem zdravljenju. Pri bolniki z genotipom 3 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo nismo beležili ponovitve bolezni niti v preiskovani niti v kontrolni skupini, pri bolnikih z visoko viremijo pa je prišlo do ponovitve bolezni pri 7 % bolnikov v preiskovani skupini in v 10 % v kontrolni skupini, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p=0,758$). Rezultati naše raziskave so primerljivi z objavljenimi kliničnimi raziskavami, kjer so pri naivnih bolnikih z genotipom 3 beležili ponovitev bolezni med 8 in 23 % (Manns in sod., 2011; Zeuzem in sod., 2004). Ugotovili so tudi, da imajo bolniki z visoko plazemsko viremijo (opredeljena kot HCV RNK nad 600.000 IU/ml) statistično značilno večji delež ponovitve bolezni kot bolniki z nizko viremijo. Tudi pri naših bolnikih z genotipom 3 so bile razlike med pojavnostjo ponovitve bolezni glede na višino plazemske viremije, vendar razlika med obema skupinama ni bila statistično značilna.

Drugačen izsledke analize smo dobili pri bolnikih z genotipom 1, kjer smo ugotovili, da dodatek FLU bolnikom z visoko plazemsko viremijo statistično značilno zmanjša pojavnost ponovitve bolezni. Tako smo pri bolnikih v preiskovani skupini z visoko izhodiščno plazemsko viremijo beležili ponovitev pri 5 %, medtem ko v kontrolni skupini kar v 41 %, razlika pa je bila statistično značilna ($p=0,004$). Podobne izsledke raziskave je leta 2013 objavil tudi Atsukawa s sod. (2013), saj je ugotovili, da dodatek FLU statistično značilno zmanjša pojavnost ponovitve bolezni pri bolnikih z genotipom 1 in visoko plazemsko viremijo v primerjavi z bolniki z nizko izhodiščno viremijo ($p=0,042$). Pri

bolnikih, ki so dodatno prejeli FLU, je prišlo do ponovitve bolezni v 8,7 %, v kontrolni skupini pa v 34,6 %, kar je primerljivo z rezultati naše raziskave. Pri bolnikih z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo razlike v pojavnosti ponovitve bolezni med preiskovanci in kontrolami v naši raziskavi nismo potrdili.

Znano je, da se med zdravljenjem CHC lahko pojavijo številni neželeni učinki zdravil, ki pomembno vplivajo na kvaliteto bolnikovega življenja, lahko pa vodijo tudi do resnih zapletov, ki zahtevajo farmakološke ukrepe. Najpogosteje so bolniki v objavljenih mednarodnih raziskavah navajali utrujenost (44 do 62 %), glavobol (47 do 62 %), bolečine v mišicah (37 do 56 %), bolečine v sklepih (24 do 34 %), slabost (29 do 43 %) in izgubo telesne teže (17 do 29 %). Pogoste so bile tudi motnje razpoloženja (15 do 41 %), kar v 21 do 36 % so navajali izpadanje las (Fried in sod., 2002; Hadziyannis in sod., 2004; Manns in sod., 2001). Prav tako so bolniki v naši raziskavi navajali predvsem utrujenosti (47 do 50 %) in izgubo telesne teže (16 do 19 %), medtem ko so v primerjavi z ostalimi raziskavami manj tožili o splošnih neželenih učinkih zdravljenja kot so bolečine v mišicah (13 do 16 %), bolečine v sklepih (8 do 16 %), glavobol (11 do 13 %), izpadanje las (10 do 14 %) in slabost (2 do 5 %). Motnje razpoloženja so se pri naših bolnikih pojavljale pri 13 do 19 %, pri skupno dveh bolnikih pa je bilo potrebno zdravljenje v psihiatrični bolnišnici. Med neželenimi učinki zdravljenja so se pojavile tudi motnje v delovanju ščitnice. Hipotireoza se je razvila pri 3 % bolnikih v preiskovani skupini ter 2 % bolnikov v kontrolni skupini, medtem ko je do hipertireoze prišlo pri 4,7 % bolnikih v preiskovani skupini in 2 % bolnikov v kontrolni skupini, razlika ni bila statistično značilna ($p=0,39$). Tovrstna pojavnost obolenja ščitnice je primerljiva z ostalimi slovenskimi raziskavami, kjer je prišlo do razvoja hipotireoze pri 1,5 do 5,2 % bolnikov in v 2,6 % do hipertireoze (Brinovec in sod., 2004; Selič Kurinčič in sod., 2012).

Zaradi hujše stopnje anemije (padec hemoglobina pod 100 g/l) smo morali v preiskovani skupini pri 12,5 % bolnikih zmanjšati odmerek RBV v primerjavi s kontrolno skupino, kjer smo le-tega znižali pri štirih (4 %) bolnikih, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p=0,06$). Prilaganje odmerka RBV zaradi anemije je primerljivo z raziskavami, v katerih so znižali odmerek RBV pri 9 do 15 % bolnikov (Manns in sod., 2001; Zeuzem in sod., 2006). V naši raziskavi je 6 % bolnikov v preiskovani skupini in 3 % v kontrolni skupini

potrebovalo eritropoetin, razlika med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,36$). Odstotek predpisovanja eritropoetina je primerljiv s francosko raziskavo, kjer so eritropoetin predpisali pri 8 % bolnikov (Thévenot in sod., 2007).

Pri 68,8 % bolnikov v preiskovani skupini in 58 % bolnikov v kontrolni skupini smo v naši raziskavi beležili zmanjšanje števila levkocitov pod mejo normalnega, vendar hujša stopnja nevtropenije, ki bi zahtevala zdravljenje, ni bila pogosta. Tako je granulocitne kolonije stimulirajoči faktor prejelo 1,6 % bolnikov v preiskovani skupini in 4 % bolnikov iz kontrolne skupine, kar ne predstavlja statistično značilne razlike ($p=0,42$). Predpisovanje granulocitne kolonije stimulirajočega faktorja je tako primerljivo z raziskavami, v katerih so le-tega bolniki med zdravljenjem CHC prejeli v 4 % (Thévenot in sod., 2007).

Zelo pomemben izsledok naše raziskave je bila tudi ocena varnosti uporabe FLU pri bolnikih s CHC. Ugotovili smo, da je sočasna uporaba FLU varna, saj nismo pri nobenem od bolnikov beležili hujših stranskih učinkov. Enemu od bolnikov smo predčasno ukinili FLU, zaradi pomembnega porasta ravni GGT, vendar v primerjavi s kontrolno skupino razlika ni statistično značilna ($p=0,4$). Porasta ravni GGT pri bolniku ne moremo vzročno opredeliti, saj je prejel sočasno tudi druga jetrom škodljiva zdravila. Naši rezultati potrjujejo izsledke številnih kliničnih raziskav, v katerih so ugotovili, da je uporaba statinov pri bolnikih s CHC varna (Chalasan in sod., 2004; Gibson in Rindone, 2005; Henderson in sod., 2010; Krishna in sod., 2006).

Z opravljeno raziskavo smo dokazali, da dodatek FLU v odmerku 80 mg dnevno k SOC pri bolnikih z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml), statistično značilno izboljša SVR. Učinkovitost dodatka FLU v nižjih dnevniških odmerkih na SVR pri bolnikih z genotipom 1 potrjujejo tudi druge raziskave (Georgescu in sod., 2011; Kondo in sod., 2012). Na temelju vseh opravljenih raziskav menimo, da je dodatek FLU v odmerkih 20 do 80 mg dnevno v kombinaciji s PEG-IFN α in RBV klinično pomemben in bi bilo smiselno razmisliti o njegovi vključitvi v standardno zdravljenje bolnikov z genotipom 1 in visoko plazemsko viremijo (Georgescu in sod., 2011; Kondo in sod., 2012; Sezaki in sod., 2009; Selič Kurinčič in sod., 2014). Raziskava je potrdila tudi varnost uporabe odmerka FLU 80 mg dnevno.

Fluvastatin pa bi se lahko izkazal tudi pri zdravljenju bolnikov z genotipom 1 s proteaznimi inhibitorji (boceprevir, telaprevir), katerih bliskovit razvoj poteka zadnjih nekaj let. Kljub temu, da je uspešnost zdravljenja naivnih bolnikov s kombinacijo proteaznega inhibitorja, PEG-IFN α in RBV za 25 do 30 % večja od dvojne kombinacije PEG-IFN α in RBV, se ob tem že pojavljajo sevi virusa, odporni na tovrstne učinkovine (EASL, 2014; Jacobson in sod., 2011; Poordard in sod., 2011). Pred uvedbo zdravljenja z boceprevirom so pri 7 % bolnikov našli z odpornostjo povezane aminokislinske variante (*angl.* resistance associated amino acid variants, RAV), po začetku zdravljenju so le-te našli pri 15 % bolnikov. Pri bolnikih, ki niso dosegli SVR, so zaznali RAV kar v 53 % (Barnard in sod., 2013). Prve raziskave *in vitro* o razvoju odpornosti HCV na nove učinkovine kažejo, da bi utegnila kombinacija protivirusnih učinkovin s statini upočasniti oz. preprečiti razvoj sevov, odpornih na proteazne inhibitorje (Delang in sod., 2009). Med statini bi bil najprimernejši FLU, saj je zanj značilno, da se ne metabolizira preko citokroma P450 3A4, kar je značilno za boceprevir in telaprevir, temveč preko citokroma P450 P2C9, zaradi česar FLU ni kontraindiciran pri hkratnem zdravljenju s proteaznimi inhibitorji, kar velja za številna druga zdravila, tudi za ostale statine (Burger in sod., 2013; Stancu in Sima, 2001). Glede na ugotovitev, da je bila pri bolnikih, zdravljenih s trojno kombinacijo (boceprevir, PEG-IFN α in RBV) in z znižanjem virusnega bremena po štirih tednih zdravljenja za $\geq 1\text{-log}_{10}$, koncentracija RAV dvakrat manjša kot pri slabo odzivnih, bi dodatek FLU lahko imel pomembno vlogo v štiri-tedenskem uvajalnem obdobju zdravljenja (Barnard in sod., 2013). Pomembna razlika pri delovanju na HCV med DAA in FLU je tudi ta, da statini zavirajo pomnoževanje virusa posredno, preko učinkovanja na gostiteljev metabolizem, zato do razvoja odpornih sevov, značilnih za DAA, ne more priti. Pomen dodanega statina kombinaciji proteaznega inhibitorja (boceprevir), PEG-IFN α in RBV potrjujejo tudi izsledki obsežne mednarodne klinične raziskave, kjer so ugotovili, da predhodno jemanje statina statistično značilno ugodno vpliva na SVR (Poordard in sod., 2011).

Po nam dostopnih podatkih iz literature je naša raziskava prva na svetu, v kateri smo raziskovali vpliv dodanega FLU v kombinaciji s PEG-IFN α in RBV pri bolnikih z genotipom HCV 3. V preiskovani skupini so bolniki dosegli SVR v 95 % in v kontrolni

skupini v 92 %, kar ne predstavlja statistično značilne razlike ($p=0,661$). Ob tem dopuščamo možnost napake tipa II, kar pomeni, da s statistično analizo nismo odkrili razlike med skupinama, čeprav razlika dejansko obstaja. V primerjavi z obsežnimi kliničnimi raziskavami, v katerih bolniki dosegajo SVR v 66 do 79 %, so bolniki v naši raziskavi tako v preiskovani kot kontrolni skupini dosegli zelo dober SVR (Shiffman in sod., 2007; Zeuzem in sod., 2004).

Pomanjkljivost naše raziskave je predvsem v tem, da ni bila randomizirana glede jemanja FLU. Poleg tega so podskupine, pri katerih smo izvajali statistično analizo, imele majhno število bolnikov, zato je potrebna previdnost pri posploševanju rezultatov na širšo populacijo. Tudi osnovne značilnosti bolnikov so bile zelo ugodne, saj je bilo malo bolnikov starih nad 40 let (21 %) in malo bolnikov z zelo napredovalo jetrno boleznijo oz. cirozo (9 %). Zaradi tega menimo, da so potrebne dodatne široko zastavljene klinične raziskave, ki bodo ugotovljale vpliv dodanega FLU na učinkovitost zdravljenja CHC genotipa 3 kot tudi genotipa 1.

6 SKLEPI

- Trajni virološki odziv je doseglo 89 % bolnikov v preiskovani skupini in 79,6 % v kontrolni skupini ($p=0,12$), ne glede na vrsto genotipa HCV in izhodiščno plazemsko viremijo.
- Dodatek FLU v odmerku 80 mg dnevno kombinaciji PEG-IFN α in RBV ni imel vpliva na virološki odziv v četrtem in dvanajstem tednu zdravljenja ter ob njegovem zaključku pri bolnikih okuženih z genotipoma HCV 1 ali 3, ne glede na izhodiščno plazemsko viremijo.
- Bolniki z genotipom 1 so, ne glede na izhodiščno plazemsko viremijo, dosegli SVR v preiskovani skupini v 81 %, medtem ko so v kontrolni skupini dosegli SVR v 64 % ($p=0,138$). Pri bolnikih z genotipom 3 smo beležili SVR pri preiskovani skupini v 95 % in pri kontrolni skupini v 92 % ($p=0,661$). V primerjavi z uspešnostjo zdravljenja bolnikov z genotipom 1 in 3 v objavljenih mednarodnih raziskavah, ugotavljamo, da naši bolniki dosegajo SVR v višjih deležih kot to navaja svetovna literatura.
- Z opravljeno raziskavo smo dokazali, da dodatek FLU 80 mg dnevno kombinaciji PEG-IFN α in RBV pri bolnikih z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK >400.000 IU/ml) statistično značilno izboljša SVR. Bolniki v preiskovani skupini so dosegli SVR v 75 %, v kontrolni skupini, zdravljeni le s kombinacijo PEG-IFN α in RBV, pa v 41 %, kar predstavlja statistično značilno razliko ($p=0,024$).
- Pri bolnikih z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo (HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml) nismo dokazali vpliva dodanega FLU kombinaciji PEG-IFN α in RBV na ozdravitev, saj so bolniki v preiskovani skupini dosegli SVR v 100 % in v kontrolni skupini v 87 %, kar ne predstavlja statistično značilne razlike ($p=0,224$).
- Naša raziskava je prva v svetu, v kateri smo raziskovali vpliv dodanega FLU v kombinaciji s PEG-IFN α in RBV pri bolnikih z genotipom 3. V raziskavi nismo dokazali vpliva FLU na uspeh zdravljenja, saj so bolniki dosegli SVR v 95 % in v

kontrolni skupini v 92 %, kar ne predstavlja statistično značilne razlike ($p=0,661$).

- V raziskavi smo potrdili, da sta starost bolnika ≤ 40 let ob pričetku zdravljenja ($p < 0,001$) in jetrna steatoza < 5 % ($p = 0,01$) statistično značilno pomembna napovedna kazalca za SVR. Od virusnih dejavnikov pa SVR statistično značilno pogosteje napovedujeta okužba z genotipom 3 ($p < 0,001$) in izhodiščni HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml ($p < 0,001$), kar je v skladu z ugotovitvami objavljenih v mednarodnih raziskavah.
- Pri bolnikih z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo ter bolnikih z genotipom 3 dodatek FLU k kombinaciji s PEG-IFN α in RBV ni vplival na ponovitev bolezni po dosegu aviremije ob zaključku zdravljenja.
- Pri bolnikih z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo je dodani FLU značilno zmanjšal delež tistih s ponovitvijo bolezni. Pri bolnikih v preiskovani skupini se je viremija ponovila pri 5 %, v kontrolni skupini pa kar pri 41 %, kar predstavlja statistično značilno razliko ($p = 0,004$).
- Pojavnost stranskih učinkov in farmakološko zdravljenje hematoloških stranskih učinkov (anemija, nevtropenija) ter obolenja ščitnice v naši raziskavi so primerljivi s pojavnostjo stranskih učinkov in načinom zdravljenja v obsežnih kliničnih mednarodnih raziskavah.
- Z našo raziskavo smo potrdili, da je sočasna uporaba FLU pri bolnikih s CHC varna, saj nismo pri nobenemu od bolnikov beležili hujših stranskih učinkov.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Kronični hepatitis C ostaja pomemben svetovni javnozdravstveni problem, saj je po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije okuženih od 2 do 3 % svetovnega prebivalstva. V Sloveniji je ocenjena pojavnost okužbe pod 1 %. Zadnjih deset let predstavlja standardno zdravljenje CHC kombinacija PEG-IFN α in RBV. Sicer pa zdravljenje CHC predstavlja eno izmed najučinkovitejših protivirusnih zdravljenj, saj SVR pri več kot 99 % bolnikov pomeni trajno ozdravitev. V literaturi objavljene klinične raziskave kažejo, da s trenutno uveljavljeno standardno kombinacijo PEG-IFN α in RBV doseže SVR 42 do 52 % bolnikov z genotipom 1 in 66 do 79 % bolnikov z genotipom 3.

Z raziskavami *in vitro* so ugotovili, da HCV za pomnoževanje potrebuje celični geranilgeranil, ki nastaja intracelularno pri sintezi holesterola v hepatocitih. Zato lahko zaviralci sinteze holesterola (statini) vplivamo na pomnoževanje virusa v hepatocitih. Od vseh preiskovanih statinov je imel najmočnejšo zaviralno aktivnost FLU, potrdili pa so tudi sinergistični zaviralni učinek FLU v kombinaciji z interferonom.

Osnovni namen doktorske disertacije je bil ugotoviti vpliv dodanega FLU na učinkovitost zdravljenja CHC s standardno kombinacijo PEG-IFN α in RBV pri bolnikih z genotipoma HCV 1 in 3. Dodaten namen raziskave je bila presoja varnosti zdravljenja bolnikov s CHC s FLU.

V prospektivno zasnovano raziskavo smo vključili predhodno nezdravljene (naivne) bolnike, okužene z genotipoma HCV 1 in 3, ki so bili zdravljeni v skladu s slovenskimi nacionalnimi usmeritvami za zdravljenje CHC iz leta 2007. Bolniki v preiskovani skupini so prejeli FLU 80 mg dnevno v kombinaciji s SOC, bolnike v kontrolni skupini smo zdravili le s SOC. Preiskovana in kontrolna skupina sta bili med seboj primerljivi po spolu, starosti in genotipu HCV. Mejo med nizko in visoko izhodiščno plazemsko viremijo smo opredelili pri HCV RNK 400.000 IU/ml.

Virološki odzivi med zdravljenjem se niso razlikovali med preiskovano in kontrolno skupino. Bolniki z genotipom 1 so v preiskovani skupini dosegli SVR v 81 %, v kontrolni

skupini pa v 64 %, kar ne predstavlja statistično značilne razlike ($p=0,661$). Dodatna analiza podskupine je pokazala, da je dodatek FLU k SOC statistično značilno izboljšal SVR pri bolnikih z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo ($p=0,024$), saj so bolniki v preiskovani skupini dosegli SVR v 75 % in v kontrolni skupini v 41 %. Pri bolnikih z genotipom 1 in nizko izhodiščno plazemsko viremijo ter bolnikih z genotipom 3 dodatek FLU ni značilno vplival na SVR glede na kontrolno skupino.

Kombinacija FLU in SOC je statistično značilno zmanjšala tudi ponovitev bolezni ($p=0,042$) pri bolnikih z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo v primerjavi s kontrolami. Pri bolnikih z genotipom 1 in nizko izhodiščno viremijo ter tistih z genotipom 3 vpliva FLU na ponovitev bolezni nismo potrdili.

Z logistično regresijo (bivariatna, multivariatna analiza) smo opredelili štiri napovedne kazalce, ki so statistično značilno izboljšali SVR. To so: okužba z genotipom 3 ($p<0,001$), izhodiščni HCV RNK ≤ 400.000 IU/ml ($p<0,001$), starost bolnika ob pričetku zdravljenja ≤ 40 let ($p<0,001$) in jetrna steatoza <5 % ($p=0,01$).

V naši raziskavi se je raba FLU pri bolnikih s CHC izkazala za povsem varno.

Z raziskavo smo dokazali, da dodatek FLU 80 mg dnevno kombinaciji PEG IFN α in RBV značilno pripomore k večji učinkovitosti zdravljenja bolnikov z genotipom 1 in visoko izhodiščno plazemsko viremijo, zato bi bilo pri takih bolnikih smiselno razmisliti o njegovi vključitvi v standardno zdravljenje. Kljub temu, da nismo dokazali vpliva dodatka FLU na SVR pri bolnikih z genotipom 3 menimo, da bi glede na objavljene rezultate o SVR v tej skupini bolnikov bilo smiselno izvesti dodatne široko zastavljene klinične raziskave.

7.2 SUMMARY

Chronic hepatitis C remains an important public health problem with estimated prevalence of HCV infection between 2 and 3 %. In Slovenia, the prevalence of HCV infection is estimated below 1%. For the last ten years the combination of PEG-IFN α and RBV has presented a SOC for CHC. Patients who achieve SVR are considered cured in more than 99% according to the long-term follow-up studies. In clinical studies SVR was achieved in 42-52% of genotype 1 patients and in 66-79% of genotype 3 patients treated with SOC.

In vitro studies showed that elements of cholesterol-biosynthetic pathways play a critical role in HCV replication, especially geranylgeranyl which is required for HCV replication. This is the reason why statins can inhibit HCV RNA replication. Fluvastatin showed the strongest inhibition on viral replication, moreover, in combination with interferon it had a synergistic inhibitory effect on HCV replication.

The primary aim of the present study was to investigate the impact of added FLU to SOC on SVR in a cohort of patients infected with HCV genotypes 1 and 3 and also to find out the safety of FLU in CHC patients.

The prospective study enrolled naive CHC genotypes 1 and 3 patients treated according to the 2007 Slovene national consensus guidelines. In the FLU group patients received FLU 80 mg daily in combination with SOC. Historical controls matching the study group in genotype, age and gender, were treated with SOC only. The limit of low and high baseline viremia was set at HCV RNA 400,000 IU/ml.

On-treatment viral responses did not differ significantly between the two groups. In genotype 1, SVR was achieved in 81% in the FLU group compared to 64% in the control group, the difference not being significant ($p=0.661$). Further analysis of the sub-groups showed that addition of FLU to SOC significantly improved SVR in genotype 1 patients with high baseline viral load ($p=0.024$). In genotype 1 patients with low baseline viral load and in genotype 3 patients addition of FLU to SOC showed no improvement in SVR.

Combination of FLU and SOC also significantly reduced viral relapse rate ($p=0.042$) in patients with CHC genotype 1 and high baseline viral load but not in genotype 1 patients

with low baseline viral load and genotype 3 patients.

Bivariate and multivariate logistic regression identified four pretreatment factors that were being associated with higher odds of SVR: HCV genotype 3 infection ($p < 0.001$), low baseline viral load $\leq 400,000$ IU/ml ($p < 0.001$), patients ≤ 40 years old ($p < 0.001$) and steatosis $< 5\%$ ($p = 0.01$).

In the present study FLU use in patients with CHC proved to be safe.

In conclusion, addition of FLU 80 mg daily to PEG IFN α and RBV significantly improves SVR in genotype 1 patients with high baseline viral load and should be prescribed in this sub-group of patients. Although FLU did not improve SVR in genotype 3 patients, according to previously reported SVR rates further clinical research on the combination of SOC and FLU is warranted.

8 VIRI

- Adinolfi L.E., Gambardella M., Andreana A., Tripodi M.F., Utili R., Ruggiero G. 2001. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology*, 33, 6: 1358-1364.
- Agresti A. 2007. An introduction to categorical data analysis. 2nd ed. Hoboken, John Wiley: 138-138.
- André P., Komurian-Pradel F., Deforges S., Perret M., Berland J.L., Sodoyer M., Pol S., Bréchet C., Paranhos-Baccalà G., Lotteau V. 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of Virology*, 76: 6919-6928.
- Angulo P. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, 346: 1221-1231.
- Atsukawa M., Tsubota A., Kondo C., Itokawa N., Narahara Y., Nakatsuka K., Hashimoto S., Fukuda T., Matsushita Y., Kidokoro H., Kobayashi T., Kanazawa H., Sakamoto C. 2013. Combination of fluvastatin with pegylated interferon/ribavirin therapy reduces viral relapse in chronic hepatitis C infected with HCV genotype 1b. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28, 1: 51-56.
- Bacon B.R., Gordon S.C., Lawitz E., Marcellin P., Vierling J.M., Zeuzem S., Poordad F., Goodman Z.D., Sings H.L., Boparai N., Burroughs M., Brass C.A., Albrecht J.K., Esteban R. 2011. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*, 364: 1207-1217.
- Bader T., Fazili J., Madhoun M., Aston C., Hughes D., Rizvi S., Seres K., Hasan M. 2008. Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *American Journal of Gastroenterology*, 103: 1383-1389.
- Barnard R.J., Howe J.A., Ogert R.A., Zeuzem S., Poordad F., Gordon S.C., Ralston R., Tong X., Sniukiene V., Strizki J., Ryan D., Long J., Qiu P., Brass C.A., Albrecht J.,

- Burroughs M., Vuocolo S., Hazuda D.J. 2013. Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical studies. *Virology*, 444: 329-336.
- Bartenschlager R., Cosset F.L., Lohmann V. 2010. Hepatitis C virus replication cycle. *Journal of Hepatology*, 53: 583-585.
- Bassendine M.F., Sheridan D.A., Felmlee D.J., Bridge S.H., Toms G.L., Neely R.D. 2011. HCV and the hepatic lipid pathway as a potential treatment target. *Journal of Hepatology*, 55: 1428-1440.
- Bedossa P., Poynard T. 1996. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*, 24: 289-293.
- Berg T., von Wagner M., Hinrichsen H., Heintges T., Buggisch P., Goeser T., Rasenack J., Pape G.R., Schmidt W., Kallinowski B., Klinker H., Spengler U., Alshuth U., Zeuzem S. 2006. Definition of a pre-treatment viral load cut-off for an optimized prediction of treatment outcome in patients with genotype 1 infection receiving either 48 or 72 weeks peginterferon alfa-2A plus ribavirin. *Hepatology*, 44, 4, Suppl. 1: 321A-321A.
- Blackard J.T., Kemmer N., Sherman K.E. 2006. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology*, 44: 15-22.
- Bressler B.L., Guindi M., Tomlinson G., Heathcote J. 2003. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38: 639-644.
- Brinovec V., Lešničar G., Maticič M., Meglic Volkar J., Poljak M., Seme K., Ferlan-Marolt V. 2002. Efficacy of chronic hepatitis C therapy with interferon alpha in Slovenia. *Hepatogastroenterology*, 49: 1320-1325.
- Brinovec V., Lešničar G., Meglic Volkar J., Maticič M., Baklan Z., Poljak M., Seme K., Ferlan-Marolt V., Luzar B. 2004. Treatment of chronic hepatitis C: our experience. *Hepatogastroenterology*, 51: 494-499.

- Burger D., Back D., Buggisch P., Buti M., Craxí A., Foster G., Klinker H., Larrey D., Nikitin I., Pol S., Puoti M., Romero-Gómez M., Wedemeyer H., Zeuzem S. 2013. Clinical management of drug-drug interactions in HCV therapy: Challenges and solutions. *Journal of Hepatology*, 58, 4: 792-800.
- Cacoub P., Poynard T., Ghillani P., Charlotte F., Olivi M., Piette J. C., Opolon P. 1999. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. *Multidepartment Virus C. Arthritis and Rheumatism*, 42: 2204-2212.
- Castera L., Hezode C., Roudot-Thoraval F., Lonjon I., Zafrani E. S., Pawlotsky J.M., Dhumeaux D. 2004. Effect of antiviral treatment on evolution of liver steatosis in patients with chronic hepatitis C: indirect evidence of a role of hepatitis C virus genotype 3 in steatosis. *Gut*, 53: 420-424.
- Castera L., Chouteau P., Hezode C., Zafrani E.S., Dhumeaux D., Pawlotsky J.M. 2005. Hepatitis C virus induced hepatocellular steatosis. *American Journal of Gastroenterology*, 100: 711-715.
- Castera L., Sebastiani G., Le Bail B., de Ledinghen V., Couzigou P., Alberti A. 2010. Prospective comparison of two algorithms combining non-invasive methods for staging liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 52: 191-198.
- Chalasani N., Aljadhey H., Kesterson J., Murray M.D., Hall S. 2004. Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity. *Gastroenterology*, 126: 1287-1292.
- Chen S.L., Morgan T.R. 2006. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *International Journal of Medical Sciences*, 3, 2: 47-52.
- Cheney C.P., Chopra S., Graham C. 2000. Hepatitis C. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14, 3: 633-667.
- Choo Q.L., Kuo G, Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. 1989. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 4902: 359-362.

- Chung R.T., Andersen J., Volberding P., Robbins G.K., Liu T., Sherman K.E., Peters M.G., Koziel M.J., Bhan A.K., Alston B., Colquhoun D., Nevin T., Harb G., van der Horst C. 2004. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *New England Journal of Medicine*, 351, 5: 451-459.
- Cohen D.E., Anania F.A., Chalasani N., National Lipid Association Statin Safety Task Force Liver Expert Panel. 2006. An assessment of statin safety by hepatologists. *American Journal of Cardiology*, 97, 8A: 77C-81C.
- Corey K.E., Kane E., Munroe C., Barlow L.L., Zheng H., Chung R.T. 2009. Hepatitis C virus infection and its clearance alter circulating lipids: implications for long-term follow-up. *Hepatology*, 50: 1030-1037.
- Dai C. Y., Chuang W.L., Ho C.K., Hsieh M.Y., Huang J.F., Lee L.P., Hou N.J., Lin Z.Y., Chen S.C., Hsieh M.Y., Wang L.Y., Tsai J.F., Chang W.Y., Yu M.L. 2008. Associations between hepatitis C viremia and low serum triglyceride and cholesterol levels: a community-based study. *Journal of Hepatology*, 49: 9-16.
- Darling J.M., Fried M.W. 2006. Optimizing treatment regimens in hepatitis C. *Clinics in Liver Disease*, 10: 835-850.
- Davis G.L., Wong J.B., McHutchison J.G., Manns M.P., Harvey J., Albrecht J. 2003. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38: 645-652.
- De Francesco R. 1999. Molecular virology of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* 31, 1: 47-53.
- Degos F., Perez P., Roche B., Mahmoudi A., Asselineau J., Voitot H., Bedossa P., FIBROSTIC study group. 2010. Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: a multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). *Journal of Hepatology*, 53: 1013-1021.
- Delang L., Paeshuyse J., Vliegen I., Leyssen P., Obeid S., Durantel D., Zoulim F., Op de

- Beeck A., Neyts J. 2009. Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology*, 50: 6-16.
- Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. 2013. Guidelines for the management of hepatitis C virus infection. 1st ed, May 2012, The Japan Society of Hepatology. *Hepatology Research*, 43: 1-34.
- Dultz G., Seelhof M., Herrmann E., Welker M.W., Friedrich-Rust M., Teuber G., Kronenberger B., von Wagner M., Vermehren J., Sarrazin C., Zeuzem S., Hofmann W.P. 2013. Baseline MELD score predicts hepatic decompensation during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C and advanced cirrhosis. *PLoS ONE*, 8, 8: e71262, doi: 10.1371/journal.pone.0071262: 6 str.
- Egger D., Wölk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D., Bienz K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology*, 76, 12: 5974-5984.
- Esmat G., El Kassas M., Hassany M., Gamil M.E., El Raziky M. 2012. How to optimize HCV therapy in genotype 4 patients. *Liver International*, 33, Suppl. 1: 41-45.
- Esteban J. I., Sauleda S., Quer J. 2008. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of Hepatology*, 48: 148-162.
- EASL-European Association for the Study of the Liver. 2014. EASL clinical practice guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 60, 2: 392-420.
- Evans M.J., von Hahn T., Tscherne D.M., Syder A. J., Panis M., Wölk B., Hatzioannou T., McKeating J.A., Bieniasz P.D., Rice C.M. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446: 801-805.
- Fattovich G., Giustina G., Degos F., Tremolada F., Diodati G., Almasio P., Nevens F., Solinas A., Mura D., Brouwer J.T., Thomas H., Njapoum C., Casarin C., Bonetti P., Fuschi P., Basho J., Tocco A., Bhalla A., Galassini R., Noventa F., Schalm S.W., Realdi

- G. 1997. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*, 112: 463-472.
- Farquhar M.J., Hu K., Harris H.J., Davis C., Brimacombe C.L., Fletcher S.J., Baumert T. F., Rappoport J.Z., Balfe P., McKeating J.A. 2012. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *Journal of Virology*, 86, 8: 4305-4316.
- Ferenci P., Fried M.W., Shiffman M.L., Smith C.I., Marinos G., Gonçalves F.L., Häussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Chaneac M., Reddy K.R. 2005. Predicting sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD)/ribavirin. *Journal of Hepatology*, 43: 425-433.
- Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Gonçalves F., Häussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*, 347: 975-982.
- Fried M.W., Hadziyannis S.J., Shiffman M., Messinger D., Zeuzem S. 2008. Rapid virological response is a more important predictor of sustained virological response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 48, Suppl. 2: S5-S5.
- Fried M.W., Hadziyannis S.J., Shiffman M.L., Messinger D., Zeuzem S. 2011. Rapid virological response is the most important predictor of sustained virological response across genotypes in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 55: 69-75.
- Gao L., Aizaki H., He J.W., Lai M.M. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology*, 78, 7: 3480-3487.
- Gastaminza P., Cheng G., Wieland S., Zhong J., Liao W., Chisari F.V. 2008. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of Virology*, 82, 5: 2120-2129.

- Ge D., Fellay J., Thompson A.J., Simon J.S., Shianna K.V., Urban T.J., Heinzen E.L., Qiu P., Bertelsen A.H., Muir A.J., Sulkowski M., McHutchison J.G., Goldstein D.B. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461: 399-401.
- Georgescu E.F., Streba L., Teodorescu R., Mateescu G., Tataru Abagiu M. 2011. Potential enhancement of both early (EVR) and sustained (SVR) virological response by fluvastatin in chronic hepatitis C treated with standard PEGIFN-RIBAVIRIN therapy. A pilot study. *Journal of Hepatology*, 54, Suppl. 1: S110-S110.
- Ghany M.G., Strader D.B., Thomas D.L., Seeff L.B. 2009. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*, 49: 1335-1374.
- Ghany M.G., Nelson D.R., Strader D.B., Thomas D.L., Seeff L.B. 2011. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guidelines by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 54: 1433-1444.
- Giannini E.G., Savarino V., Piccotto A. 2010. Sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin is maintained during long-term follow-up of chronic hepatitis C patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 31, 4: 502-508.
- Gibson K., Rindone J.P. 2005. Experience with statin use in patients with chronic C infection. *American Journal of Cardiology*, 96: 1278-1279.
- Gopal K., Johnson T.C., Gopal S., Walfish A., Bang C.T., Suwandhi P., Pena Sahdala H.N., Clain D.J., Bodenheimer H.C., Min A.D. 2006. Correlation between beta-lipoprotein levels and outcome of hepatitis C treatment. *Hepatology*, 44: 335-340.
- Hadziyannis S.J., Sette H., Morgan T.R., Balan V., Diago M., Marcellin P., Ramadori G., Bodenheimer H., Bernstein D., Rizzetto M., Zeuzem S., Pockros P.J., Lin A., Ackrill A.M. 2004. Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *Annals of Internal Medicine*, 140: 346-355.
- Harrison S.A., Rossaro L., Hu K.Q., Patel K., Tillmann H., Dhaliwal S., Torres D.M., Koury K., Goteti V.S., Noviello S., Brass C.A., Albrecht J.K., McHutchison J.G.,

- Sulkowski M.S. 2010. Serum cholesterol and statin use predict virological response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology*, 52, 3: 864-874.
- Heim M.H. 2013. Innate immunity and HCV. *Journal of Hepatology*, 58: 564-574.
- Helle F., Dubuisson J. 2008. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 100-112.
- Henderson L.M., Patel S., Giordano T.P., Green L., El-Serag H.B. 2010. Statin therapy and serum transaminases among a cohort of HCV-infected veterans. *Digestive Diseases and Sciences*, 55: 190-195.
- Hoofnagle J.H., Mullen K.D., Jones D.B., Rustgi V., Di Bisceglie A., Peters M., Waggoner J.G., Park Y., Jones E.A. 1986. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *New England Journal of Medicine*, 315, 25: 1575-1578.
- Hoofnagle J.H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, 36, Suppl. 1: S21-S29.
- Hourigan L.F., Macdonald G.A., Purdie D., Whitehall V.H., Shorthouse C., Clouston A., Powell E.E. 1999. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology*, 29: 1215-1219.
- Huang H., Sun F., Owen D.M., Li W., Chen Y., Gale M. Jr, Ye J. 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 5848-5853.
- Hui L.M., Kench J., Farrell G.C., Lin R., Samarasinghe D., Liddle C., Byth K., George J. 2002. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17: 873-881.
- Hwang S.J., Lee S.D. 2011. Hepatic steatosis and hepatitis C: still unhappy bedfellows. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26, Suppl. 1: 96-101.

- Ikeda M., Ken-ichi A., Yamada M., Danasko H., Naka K., Kato N. 2006. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology*, 44: 117-125.
- Ikeda M., Kato N. 2007. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-hepatitis C virus (HCV) reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *Journal of Pharmacological Sciences*, 105: 145-150.
- Jacobson I.M., McHutchison J.G., Dusheiko G., Di Bisceglie A.M., Reddy K.R., Bzowej N.H., Marcellin P., Muir A.J., Ferenci P., Flisiak R., George J., Rizzetto M., Shouval D., Sola R., Terg R.A., Yoshida E.M., Adda N., Bengtsson L., Sankoh A.J., Kieffer T.L., George S., Kauffman R.S., Zeuzem S. 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*, 364: 2405-2416.
- Jensen D.M., Morgan T.R., Marcellin P., Pockros P.J., Reddy K.R., Hadziyannis S.J., Ferenci P., Ackrill A.M., Willems B. 2006. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology*, 43: 954-960.
- Kapadia S.B., Chisari V.F. 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7: 2561-2566.
- Kim J.L., Morgenstern K.A., Lin C., Fox T., Dwyer M.D., Landro J.A., Chambers S.P., Markland W., Lepre C.A., O'Malley E.T., Harbeson S.L., Rice C.M., Murcko M.A., Caron P.R., Thomson J.A. 1996. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, 87, 2: 343-355.
- Kim S.S., Peng L.F., Lin W., Choe W.H., Sakamoto N., Schreiber S.L., Chung R.T. 2007. A cell-based, high-throughput screen for small molecule regulators of hepatitis C virus replication. *Gastroenterology*, 132: 311-320.
- Kim C.V., Chang K.M. 2013. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clinical and*

Molecular Hepatology, 19: 17-25.

Klavs I., Kustec T. 2012. Drug related infectious diseases. V: Report on the drug situation 2012 of the Republic of Slovenia: 2012 national report (2011 data) to the EMCDDA by the Reitox National Focal Point Slovenia. Drev A., Štokelj R., Krek M. (eds.). Ljubljana, National Institut of Public Health: 98-100.

Klavs I., Kustec T., Kastelic Z., Grgič Vitek M. 2012. Spolno prenesene bolezni in okužba s HIV: Hepatitis C. V: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2011. Kraigher A., Sočan M., Klavs I., Frelih T., Kolman J., Čakš Jager N., Grilc E., Grgič Vitek M., Učakar M. (ur.). Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 31-31.

Kondo C., Atsukawa M., Tsubota A., Itokawa N., Fukuda T., Matsushita Y., Kidokoro H., Kobayashi T., Narahara Y., Nakatsuka K., Kanazawa H., Sakamoto C. 2012. An open-label randomized controlled study of pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with versus without fluvastatin. Journal of Viral Hepatitis, 19: 615-622.

Krishna V., Maan M., Yen R., Mahl T. 2006. Effect of statin use in patients with chronic HCV. Hepatology, 44, Suppl. 1: 520A-520A.

Kumar D., Farrell G.C., Fung C., George J. 2002. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. Hepatology, 36: 1266-1272.

Lau D.T., Kleiner D.E., Ghany M.G., Park Y., Schmid P., Hoofnagle J.H. 1998. 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. Hepatology, 28: 1121-1127.

Lauer G.M., Walker B.D. 2001. Hepatitis C virus infection. New England Journal of Medicine, 345, 1: 41-52.

Lavanchy D. 2011. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 17, 2: 107-115.

- Law M., Rudnicka A.R. 2006. Statin safety: a systematic review. *American Journal of Cardiology*, 97, 8A: 52C-60C.
- Leandro G., Mangia A., Hui J., Fabris P., Rubbia-Brandt L., Colloredo G., Adinolfi L.E., Asselah T., Jonsson J.R., Smedile A., Terrault N., Paziienza V., Giordani M.T., Giostra E., Sonzogni A., Ruggiero G., Marcellin P., Powell E.E., George J., Negro F. 2006. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology*, 130: 1636-1642.
- Lešničar G., Poljak M., Seme K., Ferlan Marolt V., Šibanc B., Cvitan S., Blatnik J. 1995. Our experience in treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha. V: 7th European congress of clinical microbiology and infectious diseases, 26-27 March, 1995, Vienna, Austria. Vienna, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease: 180-180.
- Levičnik Stezinar S., Rahne Potokar U. 2012. Presejanje krvodajalcev na označevalce okužb v Sloveniji v obdobju 1991-2010. *Zdravniški vestnik*, 81, 2: 265-273.
- Lewis J.H., Mortensen M.E., Zweig S., Fusco M.J., Medoff J.R., Belder R. 2007. Efficacy and safety of high-dose pravastatin in hypercholesterolemic patients with well-compensated chronic liver disease: results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *Hepatology*. 46: 1453-1463.
- Lunder M., Žiberna L., Drevenšek G., Šabovič M. 2011. Zaščitni pleiotropni učinki statinov. *Zdravniški vestnik*, 80: 39-49.
- Mac Nicholas R., Norris S. 2010. Review article: optimizing SVR and management of the haematological side effects of peginterferon/ribavirin antiviral therapy for HCV – the role of epoetin, G-CSF and novel agents. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 31: 929-937.
- Mangia A., Santoro R., Minerva N. Ricci G.L., Carretta V., Persico M., Vinelli F., Scotto G., Bacca D., Annese M., Romano M., Zechini F., Sogari F., Spirito F., Andriulli A. 2005. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3.

New England Journal of Medicine; 352, 25: 2609-2617.

Manns M.P., McHutchison J.G., Gordon S.C., Rustgi V.K., Shiffman M., Reindollar R., Goodman Z.D., Koury K., Ling M., Albrecht J.K. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 358: 958-965.

Manns M.P., Wedemayer H., Cornberg M. 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, 55:1350-1359.

Manns M., Zeuzem S., Sood A., Lurie Y., Cornberg M., Klinker H., Buggisch P., Rössle M., Hinrichsen H., Merican I., Ilan Y., Mauss S., Abu-Mouch S., Horban A., Müller T.H., Welsch C., Chen R., Faruqi R., Pedicone L.D., Wedemeyer H. 2011. Reduced dose and duration of peginterferon alfa-2b and weight-based ribavirin in patients with genotype 2 and 3 chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 55: 554-563.

Marcellin P. 2009. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver International*, 29, Suppl. 1: 1-8.

Marcellin P., Cheinquer H., Curescu M., Dusheiko G.M., Ferenci P., Horban A., Jensen D., Lengyel G., Mangia A., Ouzan D., Puoti M., Rodriguez-Torres M., Shiffman M.L., Schmitz M., Tatsch F., Rizzetto M. 2012. High sustained virologic response rates in rapid virologic response patients in the large real-world PROPHESYS cohort confirm results from randomized clinical trials. *Hepatology*, 56, 6: 2039-2050.

Martell M., Esteban J.I., Quer J., Genescà J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., Gómez J. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology*, 66, 5: 3225-3229.

Martinot-Peignoux M., Ripault M.P., Maylim S., Boyer N., Giuily N., Castelnau C., Aselah T., Marcellin M. 2006. Optimal pretreatment viral load cut-off to predict treatment outcome in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon α -2b plus ribavirin. *Journal of Hepatology*, 46, Suppl. 1: S234-S234.

Matičič M., Brinovec V., Lešničar G., Vidmar L., Meglič Volkar J. 1999. Hepatitis C v Sloveniji. *ISIS*, 8: 49-51.

Matičič M., Meglič Volkar J., Brinovec V., Lešničar G., Baklan Z., Rajter M., Poljak M., Ferlan-Marolt V., Luzar B. 2004. Treatment of viral hepatitis C. V: *Viral hepatitis - 35 memorial meeting to professor Janez Plečnik*, 2.-3. December, Ljubljana. Ferlan-Marolt V., Luzar B. (eds.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo: 131-140.

Matičič M., Poljak M., Lunder T., Rener-Sitar K., Stojanovič L. 2008. Lichen planus and other cutaneous manifestation in chronic hepatitis C: pre- and post-interferon-based treatment prevalence vary in a cohort of patients from low hepatitis C virus endemic area. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*, 22: 779-788.

Matičič M., Kastelic A. 2009. Nacionalne usmeritve obvladovanja okužbe z virusom hepatitisa C pri uživalcih drog v Sloveniji. *Zdravniški vestnik*, 78: 529-539.

Matičič M., Kmet Lunaček N. 2009. Hepatitis in zdravstveni delavci. V: *Okužbe, povezane z zdravstvom, novosti*. Infektološki simpozij 2009, marec 2009, Ljubljana. Beović B., Strle F., Čižman M., Tomažič J. (ur.). Ljubljana, Sekcija za kemoterapijo SZD; Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana; Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 123-132.

Matičič M. 2013. *Virusni hepatitis C. Informacije za strokovno javnost*. Ljubljana, Univerzitetni Klinični center Ljubljana: 42 str.

Matičič M., Selič Kurinčič T., Kastelic A., Poljak M., Lesničar G., Meglič-Volkar J., Rajter M., Prah J., Baklan Z., Ciglarič M., Pančur M. 2013. A national multidisciplinary healthcare network for treatment of hepatitis C in people who inject drugs in Slovenia: high enrollment, adherence and sustained virological response. *Suchtmedizin in Forschung und Praxis*, 15, 4: 245-245.

McHutchison J.G., Gordon S.C., Schiff E.R., Shiffman M.L., Lee W.M., Rustgi V.K., Goodman Z.D., Ling M.H., Cort S., Albrecht J.K. 1998. Interferon alfa-2b alone or in

- combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *New England Journal of Medicine*, 339: 1485-1492.
- McHutchison J.G., Manns M., Patel K., Poynard T., Lindsay K.L., Treppe C., Dienstag J., Lee W.M., Mak C., Garaud J.J., Albrecht J.K. 2002. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 123, 4: 1061-1069.
- McHutchison J.G., Manns M.P., Muir A.J., Terrault N.A., Jacobson I.M., Afdhal N.H., Heathcote E.J., Zeuzem S., Reesink H.W., Garg J., Bsharat M., George S., Kauffman R.S., Adda N., Di Bisceglie A.M. 2010. Telaprevir for previously treated HCV infection. *New England Journal of Medicine*, 362: 1292-303.
- McKenney J.M., Davidson M.H., Jacobson T.A., Guyton J.R. 2006. Final conclusions and recommendations of the National lipid association statin safety assessment task force. *American Journal of Cardiology*, 97, 8A: 89C-94C.
- Mihăilă R., Nedelcu L., Frătilă O., Rezi E.C., Domnariu C., Ciucă R., Zaharie A.V., Olteanu A., Bera L., Deac M., Mihăilă R. 2009. Lovastatin and fluvastatin reduce viremia and the pro-inflammatory cytokines in the patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*, 56: 1704-1709.
- Mihm U., Herrmann E., Sarrazin C., Zeuzem S. 2006. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23:1043-1054.
- Milazzo L., Caramma I., Mazzali C., Cesari M., Olivetti M., Galli M., Antinori S. 2010. Fluvastatin as an adjuvant to pegylated interferon and ribavirin in HIV/hepatitis C genotype 1 co-infected patients: on open-label randomized controlled study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 735-740.
- Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. 2013. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 57: 1333-1342.
- Molina S., Castet V., Fournier-Wirth C., Pichard-Garcia L., Avner R., Harats D.,

- Roitelman J., Barbaras R., Graber P., Ghersa P., Smolarsky M., Funaro A., Malavasi F., Larrey D., Coste J., Fabre J.M., Sa-Cunha A., Maurel P. 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, 46: 411-419.
- Monto A., Alonzo J., Grunfeld C., Wright T. 2002. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contribution oh obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology*, 36: 729-36.
- Moussalli J., Opolon P., Poynard T. 1998. Management of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 5: 73-82.
- Nahmias Y., Goldwasser J., Casali M., van Poll D., Wakita T., Chung R.T., Yarmush M.L. 2008. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*, 47: 1437-1445.
- Patton H.M., Patel K., Behling C., Bylund D., Blatt L. M., Vallée M., Heaton S., Conrad A., Pockros P.J., McHutchison J.G. 2004. The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *Journal of Hepatology*, 40, 3: 484-490.
- Pawlotsky J.M., Chevaliez S., McHutchison J.G. 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*, 132: 1979-1998.
- Peng D., Han Y., Ding H., Wei L. 2008. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B patients is associated with metabolic factors more than viral factors. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23: 1082-1088.
- Perz J.F., Armstrong G.L., Farrington L.A., Hutin Y.J., Bell B.P. 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology*, 49: 529-538.
- Petruff Cheney C., Chopra S., Graham C. 2000. Hepatitis C. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14, 3: 633-667.
- Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A.J.,

- Houghton M., Rosa D., Grandi G., Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282: 938-941.
- Pockros P.J., Hamzeh F.M., Martin P., Lentz E., Zhou X., Govindarajan S., Lok A.S. 2010. Histologic outcomes in hepatitis C-infected patients with varying degrees of virologic response to interferon-based treatments. *Hepatology*, 52: 1193-1200.
- Poordard F., Rajender Reddy K., Martin P. 2008. Rapid virologic response: a new milestone in the management of chronic hepatitis C. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 78-84.
- Poordard F., McCone J. Jr, Bacon B.R., Bruno S., Manns M.P., Sulkowski M.S., Jacobson I.M., Reddy K.R., Goodman Z.D., Boparai N., DiNubile M.J., Sniukiene V., Brass C.A., Albrecht J.K., Bronowicki J.P. 2011. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*, 364: 1195-1206.
- Poynard T., Bedossa P., Opolon P. 1997. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*, 349: 825-832.
- Poynard T., Marcellin P., Lee S.S., Niederau C., Minuk G.S., Ideo G., Bain V., Heathcote J., Zeuzem S., Trepo C., Albrecht J. 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). Lancet*, 352: 1426-1432.
- Poynard T., McHutchison J., Manns M., Trepo C., Lindsay K., Goodman Z., Ling M.H., Albrecht J. 2002. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 122, 5: 1303-1313.
- Poynard T., Ratziu V., McHutchison J., Manns M., Goodman Z., Zeuzem S., Younossi Z., Albrecht J. 2003a. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*, 38: 75-85.
- Poynard T., Yuen M.F., Ratziu V., Lai C.L. 2003b. Viral hepatitis C. *Lancet*, 362: 2095-2100.

- Ramcharran D., Wahed A.S., Conjeevaram H.S., Evans R.W., Wang T., Belle S.H., Yee L.J. 2010. Associations between serum lipids and hepatitis C antiviral treatment efficacy. *Hepatology*, 52: 854-863.
- Reddy K.R., Nelson D.R., Zeuzem S. 2009. Ribavirin: current role in the optimal clinical management of chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 50: 402-411.
- Reichard O., Norkrans G., Frydén A., Braconier J.H., Sönnnerborg A., Weiland O. 1998. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alpha-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. *Lancet*, 351: 83-87.
- Rockey D.C., Caldwell S.H., Goodman Z.D., Nelson R.C., Smith A.D., American Association for the Study of Liver Diseases. 2009. Liver biopsy. *Hepatology*, 49, 3: 1017-1044.
- Rubbia Brandt L., Quadari R., Abid K., Giostra E., Male P.J., Mentha G., Spahr L., Zarski J.P., Borisch B., Hadengue A., Negro F. 2000. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *Journal of Hepatology*, 33: 106-115.
- Rubbia Brandt L., Fabris P., Paganin S., Leandro G., Male P.J., Giostra E., Carlotto A., Bozzola L., Smedile A., Negro F. 2004. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut*, 53: 406-412.
- Sabia H., Prasad P., Tom Smith H., Stoltz R.R., Rothenberg P. 2001. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of an extended-release formulation of fluvastatin administered once daily to patients with primary hypercholesterolemia. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 37: 502-511.
- Sakai A., Claire M.S., Faulk K., Govindarajan S., Emerson S.U., Purcell R.H., Bukh J. 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 20: 11646-11651.
- Santantonio T., Wiegand J., Tilman Gerlach J. 2008. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *Journal of Hepatology*, 49: 625-633.

- Sainz B. Jr, Barretto N., Martin D.N., Hiraga N., Imamura M., Hussain S., Marsh K.A., Yu X., Chayama K., Alrefai W.A., Uprichard S.L. 2012. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine*, 18, 2: 281-285.
- Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R., Vitelli A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO Journal*, 21, 19: 5017-5025.
- Schaefer M., Capuron L., Friebe A., Diez-Quevedo C., Robaeys G., Neri S., Foster G.R., Kautz A., Forton D., Pariente C. M. 2012. Hepatitis C infection, antiviral treatment and mental health: a European expert consensus statement. *Journal of Hepatology*, 57: 1379-1390.
- Schettler V., Monazahian M., Wieland E., Ramadori G., Grunewald R.W., Thomssen R., Mueller G. A. 2001. Reduction of hepatitis C virus load by H.E.L.P.-LDL apheresis. *European Journal of Clinical Investigation*, 31: 154-155.
- Schregel V., Jacobi S., Penin F., Tautz N. 2006. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13: 5342-5347.
- Scott J. D., Gretch D. R. 2007. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. *Journal of the American Medical Association*, 297: 724-731.
- Selič Kurinčič T., Matičič M., Poljak M., Seme K., Lešničar G. 2012. Zdravljenje naivnih bolnikov s kroničnim hepatitisom v Splošni bolnišnici Celje v letih 2007-2012. V: Lešničarjev simpozij ob 50-letnici delovanja samostojne infektološke službe v Celju, 16. november, Celje. Lešničar G. (ur.). Celje, Splošna bolnišnica: 119-130.
- Selič Kurinčič T., Lešničar G., Poljak M., Meglic Volkar J., Rajter M., Prah J., Baklan Z., Kotar T., Matičič M. 2014. Impact of added fluvastatin to standard-of-care treatment on sustained virological response in naive chronic hepatitis C patients infected with genotypes 1 and 3. *Intervirology*, 57, 1: 23-30.

- Seme K., Vrhovac M., Močilnik T., Matičič M., Lešničar G., Baklan Z., Meglič Volkar M., Rajter M., Štepec S., Lunar M., Poljak M. 2009. Hepatitis C virus genotypes in 1,504 patients in Slovenia, 1993-2007. *Journal of Medical Virology*, 81: 634-639.
- Seme K., Kovanda A., Poljak M. 2011. Virusi hepatitisa. V: *Medicinska virologija*. Petrovec M., Poljak M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 99-106.
- Sezaki H., Suzuki F., Akuta N., Yatsuji H., Hosaka T., Kobayashi M., Suzuki Y., Arase Y., Ikeda K., Miyakawa Y., Kumada H. 2009. An open pilot study exploring the efficacy of fluvastatin, pegylated interferon and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1b in high viral loads. *Intervirology*, 52:43-48.
- Shi K.Q., Liu W.Y., Lin X.F., Fan Y.C., Chen Y.P., Zheng M.H. 2012. Interleukin-28B polymorphisms on the SVR in the treatment of naïve chronic hepatitis C with pegylated interferon- α plus ribavirin: a meta-analysis. *Gene*, 507, 1: 27-35.
- Shiffman M.L., Suter F., Bacon B.R., Nelson D., Harley H., Solá R., Shafran S.D., Barange K., Lin A., Soman A., Zeuzem S. 2007. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *New England Journal of Medicine*, 357: 124-134.
- Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T., Simmonds P. 2014. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology*, 59, 1: 318-327.
- Stancu C., Sima A. 2001. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5, 4: 378-387.
- Sulkowski M.S. 2008. Viral hepatitis and HIV coinfection. *Journal of Hepatology*, 48, 2: 353-367.
- Suzuki T., Ishii K., Aizaki H., Wakita T. 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 1200-1212.
- Swain M.G., Lai M.Y., Shiffman M.L., Cooksley G.E., Zeuzem S., Dietrich D.T., Abergel

- A., Pessôa M.G., Lin A., Tietz A., Connell E. V., Diago M. 2010. A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology*, 139: 1593-1601.
- Terrault N.A., Dodge J.L., Murphy E.L., Tavis J.E., Kiss A., Levin T.R., Gish R.G., Busch M.P., Reingold A.L., Alter M.J. 2013. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology*, 57: 881-889.
- Thevénot T., Cadranel J.F., Di Martino V., Pariente A., Causse X., Renou C., Hagege H., Denis J., Lunel-Fabiani F. 2007. A national French survey on the use of growth factors as adjuvant treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 45: 377-383.
- Thomopoulos K.C., Arvaniti V., Tsamantas A.C., Dimitropoulou D., Gogos C.A., Siagris D., Theocharis G.J., Labropoulou-Karatza C. 2006. Prevalence of liver steatosis in patients with chronic hepatitis B: a study of associated factors and of relationship with fibrosis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18: 233-237.
- von Wagner M., Huber M., Berg T., Hinrichsen H., Rasenack J., Heintges T., Bergk A., Bernsmeier C., Häussinger D., Herrmann E., Zeuzem S. 2005. Peginterferon- α -2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 129: 522-527.
- Wang C., Gale M. Jr, Keller B.C., Huang H., Brown M.S., Goldstein J.L., Ye J. 2005. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Molecular Cell*, 18: 425-434.
- Westin J., Nordlinder H., Lagging M., Norkrans G., Wejstal R. 2002. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *Journal of Hepatology*, 37: 837-842.
- World Health Organization. 1997. Hepatitis C: global prevalence update. *Weekly Epidemiological Record*, 72: 341-438.
- Ye J., Wang C., Sumpter R., Brown M.S., Goldstein J.L., Gale M. 2003. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 26: 15865-15870.

Ye J. 2007. Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. PLoS Pathogens, 3, 8: e108, doi: 10.1371/journal.ppat.0030108: 1017-1022.

Zehnter E., Mauss S., John C., Heyne R., Moller B., Lutz T., Bokemeyer B., Kihn R., Moog G., Alshuth U., Hueppe D. 2006. Better prediction of SVR in patients with HCV genotype 1 (G1) with peginterferon alfa-2A (Pegasys) plus ribavirin: improving differentiation between low (LVL) and high baseline viral load (HVL). Hepatology, 44, 4, Suppl. 1: 328A-328A.

Zeisel M.B., Fofana I., Fafi-Kremer S., Baumert T.F. 2011. Hepatitis C virus entry into hepatocyte: Molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. Journal of Hepatology, 54: 566-576.

Zeuzem S., Feinman S.V., Rasenack J., Heathcote E.J., Lai M.Y., Gane E., O'Grady J., Reichen J., Diago M., Lin A., Hoffman J., Brunda M.J. 2000. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. New England Journal of Medicine, 343: 1666-1672.

Zeuzem S., Hultcrantz R., Bourliere M., Goeser T., Marcellin P., Sanches-Tapias J., Sarrazin C., Harvey J., Brass C., Albrecht J. 2004. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. Journal of Hepatology, 40: 993-999.

Zeuzem S., Buti M., Ferenci P., Sperl J., Horsmans Y., Cianciara J., Ibranyi E., Weiland O., Noviello S., Brass C., Albrecht J. 2006. Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. Journal of Viral Hepatitis, 44: 97-103.

Zeuzem S., Berg T., Moeller B., Hinrichsen H., Mauss S., Wedemeyer H., Sarrazin C., Hueppe D., Zehnter E., Manns M. P. 2009. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. Journal of Viral Hepatitis, 16, 2: 75-90.

Zeuzem S., Rodríguez-Torres M., Rajender Reddy K., Marcellin P., Diago M., Craxi A.,

Pockros P., Rizzetto M., Bernstein D., Shiffman M.L., Lin A., Tatsch F., Hadziyannis S. 2012. Optimized threshold for serum HCV RNA to predict treatment outcomes in hepatitis C patients receiving peginterferon alfa-2a/ribavirin. *Journal of Viral Hepatitis*, 29: 766-774.

Zignego A.L., Ferri C., Pileri S.A., Caini P., Bianchi F.B. 2007. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Digestive and Liver Diseases*, 39: 2-17.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojim mentorjema prim., izr. prof. dr. Gorazdu Lešničarju, dr. med., svetnik in izr. prof. dr. Mojci Matičič dr. med. za podporo, usmerjanje med raziskovalnim delom, predvsem pa za delitev izkušenj iz njune neizmerne zakladnice znanja.

Zahvaljujem se mag. Zvonku Baklanu, dr. med., mag. Tadeji Kotar, dr. med., Jelki Meglič Volkar, dr. med., prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med., Janji Prah, dr.med. in dr. Mojci Rajter, dr. med., ker brez njihovega prispevka raziskave ne bi bilo moč izvesti.

Hvala gospe Marti Štampe za administrativno pomoč, spodbudne besede in ker že vrsto let nesebično bdi nad bolniki s kroničnim hepatitisom.

Hvala sestrični Nini za pomoč pri oblikovanju naloge.

Iz srca hvala mojim najdražjim staršema Albini in Ediju ter možu Iztoku za vso podporo, neizmerno veliko spodbude, predvsem pa hvala za to, ker ste verjeli vame.

PRILOGE

Priloga A: Dovoljenje za objavo članka Selič Kurinčič in sod. (2014) v tiskani in elektronski obliki doktorske disertacije

Dear Dr. Selic Kurincic,

Thank you very much for your email. As to your request, I am pleased to inform you that permission is granted herewith to reuse your article

Impact of Added Fluvastatin to Standard-of-Care Treatment on Sustained Virological Response in Naïve Chronic Hepatitis C Patients Infected in with Genotypes 1 and 3
Selic Kurincic T, Lesnicar G, Poljak M, Meglic Volkar J, Rajter M, Prah J, Baklan Z, Kotar T, Maticic M. Intervirology 2014;57:23-30 (DOI: 10.1159/000354541)

for inclusion in your PhD thesis.

Yours sincerely,

Silvia Meier

Rights Manager

t [+41 61 306 14 75](tel:+41613061475)

permission@karger.com

S. Karger AG, Medical and Scientific Publishers, Allschwilerstrasse 10, 4009

Basel, Switzerland

t [+41 61 306 11 11](tel:+41613061111), f [+41 61 306 12 34](tel:+41613061234), www.karger.com

Priloga B: Objavljen članek Selič Kurinčič in sod. (2014)

Intervirology

Original Paper

Intervirology 2014;57:23–30
DOI: 10.1159/000354541

Received: May 22, 2013
Accepted: July 16, 2013
Published online: September 26, 2013

Impact of Added Fluvastatin to Standard-of-Care Treatment on Sustained Virological Response in Naïve Chronic Hepatitis C Patients Infected with Genotypes 1 and 3

Tanja Selic Kurincic^a Gorazd Lesnicar^a Mario Poljak^b Jelka Meglic Volkar^c
Mojca Rajter^c Janja Prah^c Zvonko Baklan^d Tadeja Kotar^c Mojca Maticic^c

^aDepartment of Infectious Diseases and Febrile Conditions, General Hospital Celje, Celje, ^bInstitute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, and ^cClinic for Infectious Diseases and Febrile Illnesses, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, and ^dDepartment of Infectious Diseases and Febrile Illnesses, University Clinical Centre Maribor, Maribor, Slovenia

© Free Author Copy – for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

Key Words

Chronic hepatitis C · Pegylated interferon- α · Ribavirin · Fluvastatin · Sustained virological response

Abstract

Objectives: The combination of pegylated interferon- α and ribavirin is a standard-of-care (SOC) treatment for chronic hepatitis C (CHC), and it achieves a sustained virological response (SVR) in 41–52% of genotype 1 and in 73–79% of genotype 3 patients. In a few clinical trials, the combination of fluvastatin and SOC increased the SVR in genotype 1 patients. **Methods:** This prospective study enrolled 179 naïve CHC patients. In the fluvastatin group patients received the combination of SOC and fluvastatin 80 mg daily; historical controls matching the study group in genotype, age and gender were treated with the SOC treatment only. **Results:** On-treatment viral responses as well as the SVR did not differ significantly between the two groups, except for the genotype 1 patients with a high viral load presenting a significantly higher SVR rate in the fluvastatin group (75%) compared to the control group (41%; $p = 0.024$). Multivariate logistic regression identified hepatitis C virus (HCV) genotype 3 infection ($p < 0.001$), age ≤ 40 years ($p < 0.001$), liver steato-

sis $< 5\%$ ($p < 0.01$) and low viral load ($p < 0.001$) as independent predictors of an SVR. **Conclusion:** A combination of fluvastatin and SOC significantly improved the SVR in naïve CHC patients infected with HCV genotype 1 and high viral load, but it did not improve the SVR in patients infected with HCV genotype 3.

© 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

In Central Europe the prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection is intermediate, ranging from 0.2–1.2%, with intravenous drug use being the primary mode of transmission during the last years [1, 2]. In Slovenia, which has a population of 2 million inhabitants, the prevalence of HCV infection is estimated to be below 1%, with a predominance of HCV genotype 1 (56%), followed by genotype 3 (37.8%), genotype 2 (5%) and genotype 4 (1.2%) [3, 4].

For the last 10 years, the combination of pegylated interferon- α (PEG-IFN α) and ribavirin (RBV) has presented a standard-of-care (SOC) treatment for chronic hepatitis C (CHC) [5]. Patients who achieve a sustained

KARGER

© 2013 S. Karger AG, Basel
0300-5526/14/0571-0023\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/int

Mojca Maticic
Clinic for Infectious Diseases and Febrile Illnesses
University Medical Centre Ljubljana, Japljeva ulica 2
SI-1525 Ljubljana (Slovenia)
E-Mail mojca.maticic@kclj.si

virological response (SVR) are considered cured in more than 99% of the cases according to long-term follow-up studies [6, 7]. In pivotal clinical studies, an SVR was achieved in 41–52% of genotype 1 patients and in 73–82% of genotypes 2 and 3 patients treated with a SOC treatment [8–10]. In other clinical trials, genotype 1 patients achieved an SVR in 47–50% [11, 12], and those infected with genotype 3 in 69–79% [13, 14]. The most potent pre-treatment factors for an SVR were viral genotype, baseline serum viral load, age, gender, BMI, stage of liver fibrosis and recently found genetic polymorphisms for interleukin 28B located on chromosome 19 [5, 15–17].

In vitro studies have shown that elements of cholesterol-biosynthetic pathways play a critical role in HCV replication, especially geranylgeranyl which is required for HCV replication. It has been demonstrated that statins (3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors) disrupt HCV-RNA replication in cultured hepatoma cells [18, 19]. Fluvastatin showed the strongest inhibition on viral replication, and in combination with interferon it had a synergistic inhibitory effect on HCV replication [20].

The aim of the present study was to investigate the impact of adding fluvastatin to SOC treatment on the SVR in a cohort of Slovene patients infected with HCV genotypes 1 and 3, and to determine how safe fluvastatin is for patients with CHC.

Patients and Methods

Study Design

This prospective, open-labeled, historically controlled study enrolled naïve intent-to-treat patients treated for CHC genotypes 1 and 3 according to the 2007 Slovene national consensus guidelines [21]. From September 2009 to February 2011, all of the eligible patients who agreed to participate in the study and who had provided informed consent received fluvastatin in combination with SOC treatment. All of the patients presented with baseline viremia detected by polymerase chain reaction determined by automated COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HCV Test (Roche Diagnostic Systems) with a limit of detection of 30 IU/ml HCV-RNA, carried out at the national reference laboratory. Baseline patient characteristics were evaluated including the viral load, with a high viral load presenting $>400,000$ IU/ml. Pretreatment liver biopsy was performed in all patients except in those with contraindications. Histological diagnosis was performed according to METAVIR scoring system with the fibrosis stage ranging from 0 to 4 [22].

Patients with the following were excluded: decompensated cirrhosis, coinfection with HIV or HBV, any other cause of liver disease, leucocyte count $<3,000/\text{mm}^3$, platelet count $<75,000/\text{mm}^3$, hemoglobin <13 g/dl for men and <12 g/dl for women, uncontrolled depression, untreated thyroid disease and autoimmune diseases, clinically

significant cardiovascular diseases, malignant neoplastic diseases, previous therapy with statins, and poorly controlled diabetes.

Eligible patients in the study group were treated with a combination of a weight-based dose of RBV 15 mg/kg body weight per day plus either PEG IFN α -2a 180 μg or PEG IFN α -2b 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once weekly subcutaneously since no conclusive evidence showing a preference for one of the two PEG-IFN α had been reported [5, 23]. According to the viral genotype, baseline HCV-RNA and on-treatment virological response, the treatment duration was 24–72 weeks for genotype 1 and 24 weeks for genotype 3. All patients were additionally treated with fluvastatin 80 mg daily.

The historical control group consisted of all naïve patients with CHC genotypes 1 and 3 who completed treatment and follow-up; they were recruited from the national registry of treated patients and matched the study group in genotype, age and gender. Patients in the control group were treated with SOC treatment according to the same regime as the studied group regarding the treatment optimization (virological response-guided therapy, weight-based dose of RBV and aggressive management of side effects) which is in line with the Slovenian national guidelines [21].

Complete blood count and liver function tests were performed on a 2-week basis until week 8 of treatment and thereafter monthly until the end of treatment as well as at weeks 12 and 24 after cessation of treatment. HCV-RNA concentrations were determined at baseline; weeks 4, 12 and 24; at the end of treatment, and 24 weeks after cessation of treatment. In the fluvastatin group, the creatine kinase level was checked during the treatment.

The study was approved by The National Medical Ethics Committee of the Republic of Slovenia according to the Declaration of Helsinki and in compliance with the ICH/GCP requirements of good clinical practice and all the applicable regulations of the Republic of Slovenia.

Statistical Analysis

Due to the case-control design of the study, only the patients that completed treatment of CHC and a 24-week follow-up period were analyzed in both the study and the control groups. Firstly, the matching of both groups regarding significant SVR predictors was tested using the Mantel-Haenszel test for $2 \times 2 \times 2$ comparisons, the likelihood ratio test for both groups per each specified stratum for categorical variables, and the Kruskal-Wallis test (both groups with respect to genotype and type of therapy) or t/Mann-Whitney U test for both groups per stratum [considering (non)normality of data distribution]. Analysis of the primary outcome, i.e. virological response according to genotype, viral load, pathohistological liver changes and mode of therapy, was performed using the likelihood ratio test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

The study enrolled 179 naïve CHC genotypes 1 and 3 Caucasian patients: 81 treated with SOC treatment and fluvastatin, and 98 historical controls treated with SOC treatment only. In the study group, 17 patients discontinued treatment prematurely and were excluded from further analysis (fig. 1). Table 1 shows the baseline patient characteristics of the two groups.

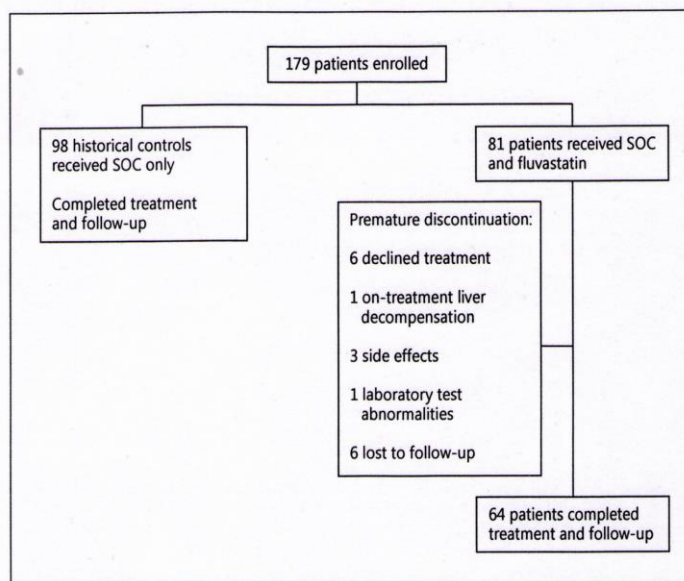


Fig. 1. Trial profile.

Response to Therapy

The overall SVR was 89% in the study group and 79.6% in the control group ($p = 0.12$). Since the study was designed in a case-control manner, a preliminary comparison of the main SVR predictor balance between the two groups was performed using bivariate testing of the following: HCV genotype, low/high viral load ($\leq 400,000$ IU/ml/ $> 400,000$ IU/ml), low/high BMI (≤ 30 / > 30), low/high age (≤ 40 years/ > 40 years), baseline low-density lipoprotein and baseline triglycerides. No significant overall difference was found ($\chi^2 = 2.5$; $p = 0.114$). However, a significant difference between the two groups was established in viral load with the fluvastatin group presenting a higher load, controlled for genotype (Mantel-Haenszel test: OR = 2.32, 95% CI: 1.17–4.59, $p = 0.023$). Kruskal-Wallis tests of absolute viral load (controlled for genotype) also showed a significant difference ($p = 0.01$), suggesting that groups do differ both in proportion of low/high viral load as well as in the absolute viral load. The results imply that the viral load should be considered as a possible confounder.

To further examine the possible confounders, data on SVR predictors were compared in both patient groups by the following four strata: (1) low viral load/genotype 1, (2) high viral load/genotype 1, (3) low viral load/genotype 3 and (4) high viral load/genotype 3. Except for the imbalance in higher triglyceride levels of the control group in

strata 3, no significant differences were found between the two groups with respect to any of the compared variables (age, BMI, liver fibrosis, baseline low-density lipoprotein and baseline triglyceride levels) in any of the four strata.

The rapid (RVR), early (EVR) and end-of-treatment (ETR) virological responses in the fluvastatin group genotype 1 were 35, 92 and 85%, respectively, while in the control group they were 42, 93 and 87%, respectively. In genotype 3 patients, RVR, EVR and ETR were 89, 100 and 100%, respectively, compared to 92, 100 and 98% in the control group, respectively. RVR, EVR and ETR did not differ significantly between the two groups (fig. 2). In the fluvastatin group, genotype 1 patients achieved an SVR in 81% of the cases compared to 64% in the control group ($p = 0.138$). In genotype 3 patients, the SVR was 95% in the fluvastatin group versus 92% in the control group ($p = 0.661$).

Data on the SVRs of the study group were tested unconditioned on HCV genotype and viral load using the χ^2 test. No significant overall difference was found ($\chi^2 = 2.5$; $p = 0.114$). Subsequently, data were tested separately by strata corresponding to the strata 1–4 with respect to the following virological responses: RVR, EVR, ETR and SVR. In the majority of subsets, virological responses did not differ significantly, except for the SVR among genotype 1 patients presenting a high viral load. In this subset,

Table 1. Baseline patient characteristics of the fluvastatin (n = 64) and the control (n = 98) groups

	All patients (n = 162)	Genotype 1		Genotype 3	
		fluvastatin (n = 26)	controls (n = 45)	fluvastatin (n = 38)	controls (n = 53)
Males	104 (64)	19 (73)	26 (58)	26 (68)	33 (62)
Age, years	35.1±9 [33]	35.2±9 [32]	39.6±11.2 [35]	32.8±4.9 [33]	32.8±7.9 [32]
≤40	128 (79)	21 (81)	27 (60)	35 (92)	45 (85)
>40	34 (21)	5 (19)	18 (40)	3 (8)	8 (15)
Risk factors					
Intravenous drug use	124 (76)	17 (65)	25 (55)	36 (94)	46 (87)
Transfusion	14 (9)	3 (12)	8 (18)	1 (3)	2 (4)
Other or unknown	24 (15)	6 (23)	12 (27)	1 (3)	5 (9)
BMI					
≤30	154 (95)	24 (92)	42 (93)	36 (94)	52 (98)
>30	8 (5)	2 (8)	3 (7)	2 (6)	1 (2)
HCV-RNA, IU/ml					
≤400,000	62 (38)	6 (23)	23 (51)	11 (29)	22 (42)
>400,000	100 (62)	20 (77)	22 (49)	27 (71)	31 (58)
Stage of liver fibrosis ^a					
0–1	83 (51)	15 (57)	19 (42)	20 (53)	29 (55)
2	43 (27)	5 (19)	10 (22)	14 (37)	14 (26)
3–4	14 (9)	3 (12)	8 (18)	0 (0)	3 (6)
Missing data	22 (13)	3 (12)	8 (18)	4 (10)	7 (13)
Steatosis					
<5%	105 (65)	18 (69)	29 (64)	23 (61)	35 (66)
>5%	35 (22)	5 (19)	8 (18)	11 (29)	11 (21)
Missing data	22 (13)	3 (12)	8 (18)	4 (10)	7 (13)
Liver enzymes, IU/l					
ALT	1.7±1.4 [1.3]	1.7±1.6 [1.3]	1.6±1.5 [0.9]	1.7±1.2 [1.4]	1.8±1.4 [1.5]
AST	1±0.7 [0.9]	1±0.7 [0.8]	1±0.9 [0.7]	1.1±0.6 [0.9]	1±0.6 [0.9]
GGT	0.9±1 [0.6]	1±1 [0.9]	0.9±0.8 [0.6]	1±0.9 [0.6]	0.8±1.2 [0.6]
Baseline glucose, mmol/l	5±1 [5]	5.3±2.1 [5]	5±0.5 [4.9]	5±0.6 [5]	4.9±0.6 [4.9]
Baseline serum lipids, mmol/l					
Total cholesterol	4.4±1 [4.4]	4.5±0.9 [4.4]	4.7±0.9 [4.8]	4.2±1.1 [3.9]	4.2±0.9 [4.3]
Triglycerides	1.3±0.7 [1.1]	1.2±0.6 [1.15]	1.3±0.4 [1.2]	1.2±0.8 [1.1]	1.4±0.9 [1.2]
HDL-cholesterol	1.4±0.4 [1.3]	1.4±0.3 [1.3]	1.5±0.5 [1.4]	1.3±0.4 [1.2]	1.3±0.3 [1.2]
LDL-cholesterol	2.4±0.8 [2.4]	2.7±0.7 [2.7]	2.5±0.9 [2.5]	2.3±0.9 [2.2]	2.3±0.7 [2.2]
Missing data	26 (16)	0 (0)	8 (18)	2 (5)	16 (30)

Results are expressed as n (%) or means ± SD with medians in square brackets. HCV-RNA represents the baseline viral load. ALT = Alanine transaminase; AST = aspartate transaminase; GGT = γ -glutamyl transaminase; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein. ^a Liver histology was graded according to METAVIR score.

an SVR was achieved in 15 of 20 patients (75%) in the fluvastatin group and in 9 of 22 patients (41%) in the control group (likelihood ratio test: 5.104, $p = 0.024$).

In order to investigate the predictive factors of an SVR, we analyzed the viral and the pretreatment host factors. Overall, the proportion of patients achieving an SVR was higher in HCV genotype 3 infection versus genotype 1 infection (93 vs. 70%, respectively), higher among patients receiving SOC treatment with added fluvastatin versus patients receiving SOC treatment only (89 vs. 80%, respec-

tively), higher in case of liver steatosis <5% versus steatosis $\geq 5\%$ (89 vs. 69%, respectively), higher in case of liver fibrosis METAVIR stages 0–1 versus METAVIR stages 2–4 (87 vs. 79%, respectively), considerably higher among younger patients (≤ 40 years) versus older ones (95 vs. 41%, respectively), higher in BMI ≤ 30 versus BMI > 30 (84 vs. 75%, respectively), and considerably higher among patients with a baseline viral load $\leq 400,000$ IU/ml versus patients with a baseline viral load $> 400,000$ IU/ml (94 vs. 77%, respectively). The differences reached significance

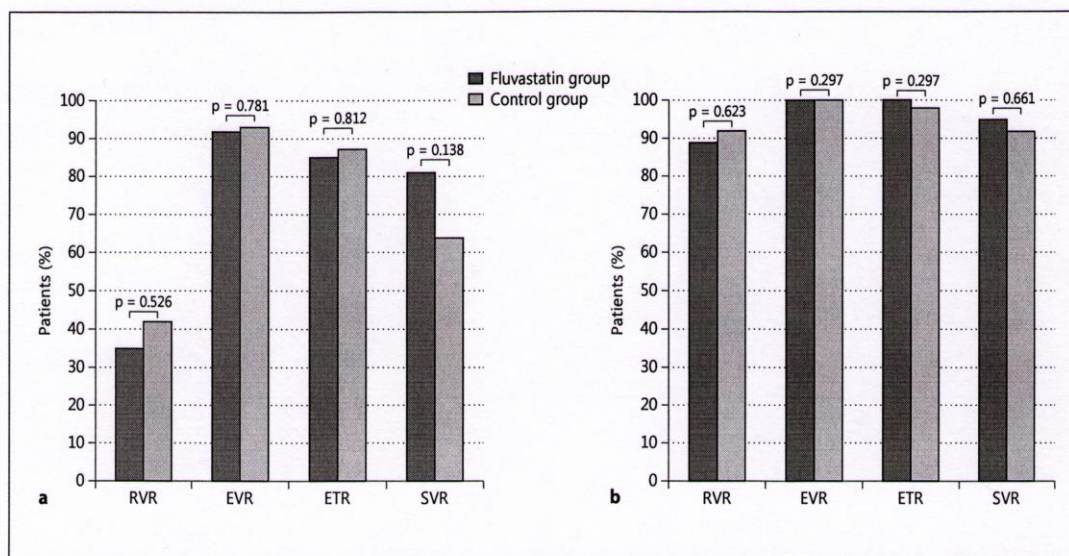


Fig. 2. Comparison of virological response rates between the fluvastatin and the control groups in patients infected with HCV genotypes 1 (a) and 3 (b).

Table 2. Results of bivariate and multivariate logistic regression in predicting failure in reaching the SVR

Predictor	Bivariate			Multivariate		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Genotype (1)	0.2	0.1–0.4	<0.001	0.1	0–0.4	<0.001
Group (control)	0.5	0.2–1.2	0.12	0.6	0.1–2.6	0.46
Age (>40)	0.04	0.02–0.11	<0.001	0.03	0.01–0.14	<0.001
Stage of fibrosis (0–1)	1.7	0.7–4.3	0.22	1.2	0.3–4.9	0.75
BMI (≤ 30)	1.7	0.3–9	0.52	0.6	0–25.9	0.81
Steatosis (<5%)	3.6	1.4–9	0.01	6.4	1.5–28.3	0.01
HCV-RNA ($\leq 400,000$)	4.3	1.4–13.2	0.01	22.6	3–171.5	<0.001

HCV-RNA represents the baseline viral load. The reference category of each predictor is indicated in parentheses.

using a multivariate logistic regression in four variables: HCV genotype 3 infection, patients ≤ 40 years old, steatosis <5% and baseline viral load $\leq 400,000$ IU/ml, all being associated with higher odds of an SVR (table 2).

Safety and Tolerability

In the fluvastatin group, RBV dose reduction due to anemia was necessary in 8 of 64 patients (12.5%) compared to 4 of 98 (4%) in the control group ($p = 0.06$). Erythropoietin was administered in 4 of 64 patients (6%)

in the fluvastatin group versus 3 of 98 (3%) in the control group ($p = 0.36$). Granulocyte colony-stimulating factor was prescribed in 1 patient out of 64 (1.6%) in the fluvastatin group versus 4 of 98 (4%) in the control group ($p = 0.42$). Most patients had mild or moderate psychiatric adverse events, although 1 patient in each group needed hospitalization at a psychiatric medical hospital. Hypothyroidism was seen in 2 of 64 patients (3%) in the fluvastatin group compared to 2 of 98 (2%) in the control group ($p = 0.69$), while hyperthyroidism presented in 3 of

64 (4.7%) of the fluvastatin group versus 2 of 98 (2%) in the control group ($p = 0.39$). One patient in the fluvastatin group (1.6%), who had also received other hepatotoxic drugs, discontinued treatment 5 months after the introduction of treatment due to an increase in γ -glutamyl transferase level ($p = 0.40$). No significant differences in side effects were detected between the two groups.

Discussion

This is the first report on the efficacy of optimized SOC treatment with added fluvastatin in HCV genotype 3-infected patients, as well as the first report on HCV genotype 1 monoinfected patients treated with a fluvastatin dose of 80 mg daily. Eligible patients received a maximal daily dose of fluvastatin approved by the FDA since there are no published data on the correlation between the oral dose of statins and the level of statins in human hepatocytes. In the last 4 years, only a few studies have been published evaluating the clinical effect of fluvastatin on viral response; however, the results have been controversial. In the first clinical trial, Bader et al. [24] reported that monotherapy with fluvastatin showed variable and often short-lived suppressive effects on viral load. In a pilot study, Sezaki et al. [25] demonstrated that the addition of fluvastatin 20 mg daily to SOC treatment might increase the SVR in patients infected with HCV genotype 1b and a high viral load. Recently, Georgescu et al. [26] and Kondo et al. [27] reported that the addition of fluvastatin 20 mg daily to SOC treatment significantly improved the SVR in patients infected with HCV genotype 1b. However, Milazzo et al. [28] reported that the addition of fluvastatin 80 mg daily to SOC treatment did not significantly improve the SVR among HIV/HCV-coinfected patients, but significantly improved RVR. According to our knowledge, no studies have been performed regarding the use of fluvastatin in genotype 3 patients.

In the present study, an SVR was achieved in more than 90% of genotype 3 patients with or without fluvastatin added to the optimized SOC treatment. In the previous studies using various regimens of SOC treatment optimization, the SVR was shown to be 68–74% [13, 29]. Overall, the combination of fluvastatin and optimized SOC treatment showed no significant improvement in the SVR among genotype 3 patients.

In genotype 1 patients, an SVR was achieved in 81% in the fluvastatin group, which is much higher compared to 37–50% in other clinical studies [12, 29]. However, compared to 64% in the control group, the difference was not

significant. Interestingly, further analysis of the subgroups showed that the addition of fluvastatin to the optimized SOC treatment significantly improved the SVR in genotype 1 patients and high viral load ($>400,000$ IU/ml), which is in accordance with published studies [26, 27].

One of the reasons for high SVR in our study and control patients was the study design since only the patients who completed treatment and follow-up were analyzed. In addition, favorable pretreatment factors, including a high rate of patients with genotype 3 infection, age ≤ 40 years (in 79%), BMI ≤ 30 (in $>95\%$), liver steatosis $<5\%$ (in 65%) and liver fibrosis METAVIR stages 0–1 (in 51%), also contributed to the results, which is in agreement with the relevant studies [5, 14, 29].

Another reason for the high SVR rate was probably the optimization of the SOC treatment in both groups, including a weight-based dose of RBV in genotypes 1 and 3, viral response-guided treatment duration according to RVR and EVR, and the aggressive management of side effects [5, 30, 31]. All of the included drug users were treated according to the Slovenian national consensus guidelines for the management of HCV infection in drug users [21]. Regular monitoring and follow-up visits of the patients enabled optimal treatment adherence to both PEG-IFN plus RBV and prescription of erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor and antidepressants to avoid premature treatment discontinuation due to side effects.

Discontinuation of fluvastatin therapy as a result of severe hepatotoxicity was needed in 1 patient only (1.6%). According to the National Lipid Association Statin Safety Task Force, patients with chronic liver disease may safely receive statin therapy [32]. Khorashadi et al. [33] reported that statin use did not increase severe hepatotoxicity in patients with HCV infection. In the present study, fluvastatin use in patients with CHC proved to be safe.

We are fully aware of some study limitations, particularly the design of a nonrandomized trial for the use of fluvastatin and a small number of patients after performing stratification and logistic regression. As a general rule, an adequate sample size for logistic regression should comprise at least 10 events per included independent variable [34]. Therefore, three predictors at most were included in the present analysis to obtain valid results. However, as this is not in accordance with the general rule, this should be borne in mind when generalizing the results to the population. Due to a relatively small total number of known CHC patients in Slovenia, a historical-control study design was performed as it was also used in other pivotal clinical trials [12, 14].

In conclusion, the present study contributes new data on the SVR in patients with CHC treated with the optimized SOC treatment plus fluvastatin. Moreover, addition of fluvastatin to SOC treatment might be an advantageous therapeutic option for the treatment of genotype 1 patients and high baseline viral load. It should also be noted that despite new treatment options for CHC, the combination of statins with protease inhibitors may result in a more potent antiviral activity, and this combina-

tion may also delay or prevent the development of resistance to protease inhibitors [35]. Moreover, fluvastatin is not contraindicated with protease inhibitors because it is mainly metabolized by cytochrome P450 2C9 and not by the cytochrome P450 3A isoenzyme, which is strongly inhibited by boceprevir and telaprevir [36, 37]. As for the genotype 3 patients, according to previously reported SVR rates, further clinical research on the combination of SOC treatment and fluvastatin is warranted.

References

- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ: Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558–567.
- Esteban JI, Sauleda S, Quer J: The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008;48:148–162.
- Maticic M, Poljak M, Lunder T, Renner-Sitar K, Stojanovic L: Lichen planus and other cutaneous manifestation in chronic hepatitis C: pre- and post-interferon-based treatment prevalence vary in a cohort of patients from low hepatitis C virus endemic area. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22:779–788.
- Seme K, Vrhovac M, Moclilnik T, Maticic M, Lesnicar G, Baklan Z, Meglic Volkar M, Rajter M, Stepec S, Lunar M, Poljak M: Hepatitis C virus genotypes in 1,504 patients in Slovenia, 1993–2007. *J Med Virol* 2009;81:634–639.
- European Association for the Study of the Liver: EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011;55:245–264.
- Swain MG, Lai MY, Shiffman ML, Cooksley GE, Zeuzem S, Dietrich DT, Abergel A, Pessoa MG, Lin A, Tietz A, Connell EV, Diago M: A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology* 2010;139:1593–1601.
- Giannini EG, Basso M, Savarino V, Piccotto A: Sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin is maintained during long-term follow-up of chronic hepatitis C patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:502–508.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves F, Haeussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975–982.
- Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM: Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 2004;140:346–355.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001;358:958–965.
- Abadir N, Marotta P, Feinman SV, Scully JL, Varenbut M, Daiter J, Farley JD: Pegatron prospective optimal weight-based dosing response program (POWER): preliminary results. *Hepatology* 2005;42:693A.
- Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, Ibranyi E, Weiland O, Noviello S, Brass C, Albrecht J: Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pre-treatment viremia. *J Hepatol* 2006;44:97–103.
- Manns M, Zeuzem S, Sood A, Lurie Y, Cornberg M, Klinker H, Buggisch P, Rössle M, Hinrichsen H, Merican I, Ilan Y, Mauss S, Abu-Mouch S, Horban A, Müller TH, Welsch C, Chen R, Faruqi R, Pedicone LD, Wedemeyer H: Reduced dose and duration of peginterferon alfa-2b and weight-based ribavirin in patients with genotype 2 and 3 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011;55:554–563.
- Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, Sarrazin C, Harvey J, Brass C, Albrecht J: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 2004;40:993–999.
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M: Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 2006;55:1350–1359.
- Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J: High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:639–644.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB: Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335–1374.
- Kapadia SB, Chisari FV: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2561–2566.
- Ye J, Wang C, Sumpter R Jr, Brown MS, Goldstein JL, Gale M Jr: Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15865–15870.
- Ikeda M, Abe K, Yamada M, Danasko H, Naka K, Kato N: Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 2006;44:117–125.
- Maticic M, Kastelic A: National guidelines for the management of hepatitis C virus infection in drug users in Slovenia. *Zdrav Vestn* 2009;78:529–539.
- Bedossa P, Poynard T: An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289–293.
- McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Noviello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS, IDEAL Study Team: Peginterferon alfa-2a or alfa-2b with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009;361:580–593.
- Bader T, Fazili J, Madhoun M, Aston C, Hughes D, Rizvi S, Seres K, Hasan M: Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1383–1389.
- Sezaki H, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Kobayashi M, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H: An open pilot study exploring the efficacy of fluvastatin, pegylated interferon and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1b in high viral loads. *Intervirology* 2009;52:43–48.
- Georgescu EF, Streba L, Teodorescu R, Mateescu G, Tataru Abagiu M: Potential enhancement of both early (EVR) and sustained (SVR) virological response by fluvastatin in chronic hepatitis C treated with standard PEGIFN-RIBAVIRIN therapy. A pilot study. *J Hepatol* 2011;54:S5–S6.

- 27 Kondo C, Atsukawa M, Tsubota A, Itokawa N, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Kobayashi T, Narahara Y, Nakatsuka K, Kanazawa H, Sakamoto C: An open-label randomized controlled study of pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with versus without fluvastatin. *J Viral Hepat* 2012;19:615–622.
- 28 Milazzo L, Caramma I, Mazzali C, Cesari M, Olivetti M, Galli M, Antinori S: Fluvastatin as an adjuvant to pegylated interferon and ribavirin in HIV/hepatitis C genotype 1 co-infected patients: an open-label randomized controlled study. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:735–740.
- 29 Jacobson IM, Brown RS Jr, Freilich B, Afdhal N, Kwo PY, Santoro J, Becker S, Wakil AE, Pound D, Godofsky E, Strauss R, Bernstein D, Flamm S, Pauly MP, Mukhopadhyay P, Griffel LH, Brass CA, WIN-R Study Group: Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* 2007; 46:971–981.
- 30 Thevenot T, Cadrel JF, Di Martino V, Pariente A, Causse X, Renou C, Hagege H, Denis J, Lunel-Fabiani F: A national French survey on the use of growth factors as adjuvant treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:377–383.
- 31 Schaefer M, Capuron L, Friebe A, Diez-Quevedo C, Robaey G, Neri S, Foster GR, Kautz A, Forton D, Pariente CM: Hepatitis C infection, antiviral treatment and mental health: a European expert consensus statement. *J Hepatol* 2012;57:1379–1390.
- 32 McKenney JM, Davidson MH, Jacobson TA, Guyton JR: Final conclusions and recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. *Am J Cardiol* 2006;97:89C–94C.
- 33 Khorashadi S, Hasson NK, Cheung RC: Incidence of statin hepatotoxicity in patients with hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:902–907.
- 34 Agresti A: Building and applying logistic regression models; in Agresti A (ed): *An Introduction to Categorical Data Analysis*. Hoboken, John Wiley, 2007, p 138.
- 35 Delang L, Paeshuysse J, Vliegen I, Leyssen P, Obeid S, Durantel D, Zoulim F, Op de Beeck A, Neyts J: Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology* 2009;50:6–16.
- 36 Burger D, Back D, Buggisch P, Buti M, Craxi A, Foster G, Klinker H, Larrey D, Nikitin I, Pol S, Puoti M, Romero-Gomez M, Wedemeyer H, Zeuzem S: Clinical management of drug-drug interactions in HCV therapy: challenges and solutions. *J Hepatol* 2012;58:792–800.
- 37 Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E, Baldeck JP, Robinson WT: The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* 1999;27:410–416.

© **Free Author Copy – for personal use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch