

# Procjena cerebrovaskularne reaktivnosti i markera endotelne disfunkcije u bolesnika s kroničnim hepatitisom C

---

**Pavičić Ivelja, Mirela**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:353133>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**MIRELA PAVIČIĆ IVELJA**

**PROCJENA CEREBROVASKULARNE REAKTIVNOSTI I  
MARKERA ENDOTELNE DISFUNKCIJE U BOLESNIKA S  
KRONIČNIM HEPATITISOM C**

**DOKTORSKI RAD**

**Akadska godina: 2020./2021.**

**Mentor:**

**izv. prof. dr. sc. Ivo Ivić, dr. med.**

**Split, travanj 2021.**

Voditelj rada: Mirela Pavičić Ivelja, dr. med.

specijalist infektolog

Klinički Bolnički Centar Split

Klinika za infektologiju

Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet u Splitu

Poslijediplomski studij EBM – Medicina utemeljena na dokazima

POSVETA: Doktorski rad posvećujem pokojnom prim. dr. Ivi Milasu koji me svojim primjerom zadužio da se svakim danom trudim biti bolja u svom pozivu.

ZAHVALA:

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivi Iviću na mentorstvu, stručnom vodstvu, prenošenju znanja i iskustva tijekom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem Vam za moj cjelokupni profesionalni razvoj i nesebičnu podršku.

Mojoj obitelji, Gorjanu, Niki i Ivanu, zahvaljujem na ljubavi, strpljenju i vjeri u moj uspjeh.

# SADRŽAJ

SADRŽAJ .....	4
POPIS OZNAKA I KRATICA .....	1
UVOD .....	2
1. HEPATITIS C .....	2
1.1. Hepatitis C virus .....	2
1.2. Epidemiologija HCV .....	2
1.3. Klinička slika hepatitisa C .....	3
1.4. Dijagnostika kroničnog hepatitisa C .....	4
1.5. Liječenje kroničnog hepatitisa C .....	4
2. CEREBROVASKULARNE BOLESTI .....	5
3. TRANSKRANIJSKI COLOR DOPPLER .....	5
4. BIOMARKERI ENDOTELNE UPALE I DISFUNKCIJE .....	6
CILJEVI I HIPOTEZE .....	7
1. HIPOTEZE .....	7
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	7
2.1. Glavni cilj .....	7
2.2. Sporedni ciljevi .....	7
METODE I MATERIJALI .....	8
1. ISPITANICI .....	8
2. UZORAK .....	8
3. METODE .....	9
4. MATERIJALI .....	9
5. STATISTIČKA OBRADA .....	10
REZULTATI .....	11
1. REZULTATI PRVOG RADA .....	11
1.1. PS brzina na početku zadržavanja daha ( $PS_{start}$ ) .....	12
1.2. PS brzina na kraju testa zadržavanja daha ( $PS_{max}$ ) .....	13
1.3. Indeks zadržavanja daha (BHI) .....	15
2. REZULTATI DRUGOG RADA .....	16
RASPRAVA .....	20

ZAKLJUČAK .....	23
KRATKI SAŽETAK.....	24
SHORT ABSTRACT .....	25
POPIS LITERATURE .....	26
ŽIVOTOPIS .....	31

## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

HCV virus hepatitisa C

RNK ribonukleinska kiselina

ALT alanin aminotransferaza

AST aspartat aminotransferaza

HBV virus hepatitisa B

DDA direktno djelujući antivirotici

HCC hepatocelularni karcinom

TCCD Transkranijski color Doppler

PI indeks pulzatilnosti

RI indeks rezistencije

CVR cerebrovaskularna reaktivnost

BHI indeks zadržavanja daha (engl. breath holding index)

CVB cerebrovaskularna bolest

ICAM-1 intracelularna adhezijska molekula-1

VCAM-1 vaskularna celularna adhezijska molekula-1

VEGF-A vaskularni endotelijalni faktor rasta

MCA srednja moždana arterija (eng. middle cerebral artery)

PS vršna sistolička brzina (eng. peak systolic velocity)

ED krajnja dijastolička brzina (eng. end diastolic velocity)

$V_{\text{mean}}$  srednja brzina protoka

# UVOD

## 1. HEPATITIS C

### 1.1. Hepatitis C virus

Kronična infekcija virusom hepatitisa C (HCV) je jedna od najčešćih kroničnih jetrenih bolesti. HCV je RNK virus koji pripada porodici Flaviviridae, rod Hepacivirus. Postoji 7 glavnih genotipova HCV-a s razlikama nukleotidnih sljedova od oko 30%, i među njima je više od 70 podtipova čiji se nukleotidni slijedovi razlikuju do 20%. Zbog nepreciznosti RNK-polimeraze virus je sklon mutacijama te se u zaraženog pojedinca istovremeno nalaze brojne genski srodne varijante. Upravo mutacije tijekom akutne infekcije omogućuju virusu izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina i prelazak u kroničnu infekciju. U oštećenju hepatocita bitnu ulogu imaju stanična imunosti i interleukin 1B kao medijator kronične upale. Proupalno okruženje, iako neučinkovito u eliminaciji virusa, potiče pojačanu ekspresiju gena koji s vremenom stimuliraju proliferaciju stanica, fibrogenezu i karcinogenezu. HCV virion je kuglasta čestica promjera 60 nm, ima lipidnu ovojnicu s površinskim glikoproteinima (E1, E2) koja okružuje nukleokapsidu s genomom u obliku jednolančane RNK. Receptor HCV-a je molekula CD81 na površini hepatocita i monocita, a replikacija virusa se odvija u citoplazmi s visokom dnevnom produkcijom viriona. (1, 2)

### 1.2. Epidemiologija HCV

HCV predstavlja globalni javnozdravstveni problem. Prema procijeni Svjetske zdravstvene organizacije 2017. godine u svijetu je bilo oko 71 milijun inficiranih ljudi. HCV je proširen širom svijeta, ali pojavnost značajno varira u različitim geografskim područjima. Područja s najvišom procijenjenom prevalencijom 2015. godine su bili istočni Mediteran (2.3%) i Europa (1.5%) s tim da je veća u istočnoj nego u zapadnoj Europi. Svake godine oko 350 000 ljudi umire od posljedica HCV infekcije, prvenstveno jetrene ciroze i hepatocelularnog karcinoma. U Hrvatskoj 20% svih transplantacija jetara su posljedica HCV-a. (3)

HCV se dominantno prenosi parenteralnim putem u kontaktu sa zaraženom krvlju (npr. preko kože nakon kontakta sa zaraženom krvlju, zaraženim organom prilikom transplantacije i

prilikom uporabe zaraženog pribora za injiciranje opijata). Nakon uvođenja obaveznog probira darovane krvi na HCV 1993. godine mogućnost prijenosa transfuzijom je svedena na najmanju mjeru (s 13 na 0.1% transfuzijskih doza). Inkubacija je 14 do 150 dana, prosječno 7 tjedana. (2)

### 1.3. Klinička slika hepatitisa C

Akutna HCV infekcija najčešće je blagog kliničkog tijeka (umor, mučnina, povraćanje, artralgijske, glavobolje, anoreksija), bez žutice, iznimno rijetko vodi do jetrenog zatajenja, ali u čak 85% inficiranih hepatitis C prelazi u kroničnu fazu bolesti. Promjene u jetri se razvijaju godinama kao posljedica hepatocelularne nekroze, upale i fibroze, tako da oko 20% oboljelih nakon 20 i više godina tihe bolesti razvije cirozu. Simptomi kronične infekcije su kronični umor i blaga bolnost pod desnim rebrenim lukom. Najčešće se dijagnoza kroničnog hepatitisa C postavi slučajnim nalazom povišenih jetrenih enzima ili, u gorem slučaju, tek kada se jave znaci uznapredovale ciroze kao što su „paukoliki“ nevasi, mučnina, gubitak apetita, atrofija testisa, ginekomastija, žutica, trombocitopenija, a u uznapredovaloj bolesti ascites, znaci portalne hipertenzije, edemi ekstremiteta i varikoziteti jednjaka. Kao krajnja komplikacija razvija se hepatocelularni karcinom (HCC) u do 4% cirotičnih bolesnika na godišnjoj razini. (4)

Brojne ekstrahepatičke komplikacije se također povezuju s kroničnom HCV infekcijom: hematološke (esencijalna miješana krioglobulinemija, B-stanični non-Hodgkin limfom), membranoproliferativni glomerulonefritis, autoimunosni poremećaji (asimptomatska prisutnost antitijela, Sjögren sindrom, autoimunski hepatitis, poremećaji štitnjače), kožne (kutana porfirija, lichen planus, leukocitoklastički vaskulitis), kardiovaskularne i neurološke bolesti, ali sve češće i sistemske manifestacije poput ateroskleroze, metaboličkog sindroma, endotelne disfunkcije i kronične upale. (2, 5, 6)



#### 1.4. Dijagnostika kroničnog hepatitisa C

U sklopu rutinske laboratorijske obrade krvna slika je najčešće u granicama normale. U nekim slučajevima prisutna je blaža limfocitoza te u biokemijskim testovima lagano povišena alanin aminotransferaza (ALT). U uznapredovaloj bolesti s razvijenom cirozom manifestiraju se makrocitna anemija, leukopenija, trombocitopenija sa znacima poremećene jetrene funkcije (snižena razina albumina i čimbenika zgrušavanja, produljeno protrombinsko vrijeme, porast bilirubina, amonijaka, aspartat aminotransferaze,  $AST > ALT$ ). Kod kliničke sumnje na kronični hepatitis potrebno je odrediti serološke biljege hepatitis B virusa (HBV) i HCV-a. Ukoliko je serologija pozitivna molekularnim metodama se potvrđuje prisutnost virusa u krvi, odnosno viremija i genotip HCV virusa. Od ostale obrade indicirano je još učiniti ultrazvuk jetara i procjenu jetrene fibroze pomoću fibroelastografije. Fibroelastografija je danas gotovo u potpunosti zamijenila biopsiju jetara jer je jednostavna, neinvazivna, jeftina metoda i može se ponavljati radi praćenja napredovanja bolesti. (2)

#### 1.5. Liječenje kroničnog hepatitisa C

S primjenom direktno djelujućih antivirusnih lijekova (DDA) od 2015. godine nastupila je revolucija u liječenju kroničnog C hepatitisa koji se sada relativno lako liječi i može biti eliminiran u gotovo svih bolesnika. Iznimno rijetko se danas koriste kombinacije ribavirina i interferona čija je upotreba praćena brojnim nuspojavama. DDA inhibiraju ključne virusne proteine i onemogućuju infekciju i replikaciju virusa. Efikasni su, dobro se toleriraju, primjenjuju se peroralno, a ukupno trajanje liječenja je 8 do 16 tjedana. Prije liječenja potrebno je odrediti genotip virusa, stadij fibroze te eventualno postojanje ekstrahepatalnih manifestacija što utječe na odabir antivirusnog lijeka i trajanje terapije. Iako su svi bolesnici s dokazanom HCV infekcijom trajanja 6 mjeseci kandidati za liječenje DDA, zbog relativne nedostupnosti lijekova uzrokovane njihovom visokom cijenom prednost imaju bolesnici s kliničko-laboratorijskim pokazateljima uznapredovale fibroze, odnosno ciroze jetara. (7) Cilj antivirusne terapije kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C je eradikacija HCV RNK što se potvrđuje nedetektabilnom virusnom RNK 12 tjedana nakon završetka terapije (trajni virološki odgovor). Kod ovih bolesnika značajno se smanjuje rizik razvoja HCC, ali apsolutni

rizik i dalje ostaje visok kod onih s cirozom te je kod njih indicirano daljnje provođenje probira na HCC bez obzira na eradikaciju HCV-a. (8)

## 2. CEREBROVASKULARNE BOLESTI

Cerebrovaskularne bolesti (CVB) obuhvaćaju poremećaje u kojima je zbog oštećenja jedne ili više krvnih žila dio moždanog tkiva privremeno ili trajno pogođen ishemijom ili krvarenjem. Restrikcije protoka krvi mogu biti posljedica sužavanja krvnih žila (stenoza), stvaranja ugrušaka (tromboza), začepljenja (embolija) ili pucanja krvnih žila (krvarenje). Nedostatan protok krvi (ishemija) pogađa moždano tkivo i može uzrokovati moždani udar. CVB su drugi vodeći uzrok smrti u svijetu, a moždani udar je vodeći uzrok dugotrajnog invaliditeta s velikim rizikom ponavljanja unutar 5 godina. Uobičajeni faktori rizika s kojima se povezuje su pušenje, konzumacija alkohola, pretilost, povišeni krvni tlak, masnoće u krvi i šećerna bolest. Sve češće se, uz gore navedene navode i drugi čimbenici rizika među kojima i infektivni uzročnici. Iako povezanost infekcije, upale i moždanog udara još uvijek nije potpuno razjašnjena, nalaz povišenih koncentracija makrofaga i upalnih medijatora u aterosklerotskom plaku govore u prilog tome da se radi o promjeni izrazito upalnog karaktera. HCV infekcija se povezuje sa sistemskom upalom i metaboličkim komplikacijama zbog kojih bi kronično inficirani bili podložniji aterosklerozi. (9) Kronična HCV infekcija povezuje se s ultrazvučno dokazanim zadebljavanjima kompleksa intime i medije koji su markeri ateroskleroze, ali i cerebrovaskularnog rizika. Iako rezultati većine provedenih istraživanja idu u prilog navedenoj tezi, još nije razjašnjen točni mehanizam kojim bi HCV uzrokovao povećanje rizika od CVB. (10-12)

## 3. TRANSKRANIJSKI COLOR DOPPLER

Transkranijski color Doppler (TCCD) omogućuje neinvazivnu procjenu intrakranijske hemodinamike glavnih arterija Wilisova kruga i vertebrobazilarnog sliva. Bilježe se sistoličke, dijastoličke i srednje brzine protoka te parametri cerebrovaskularnog otpora: indeks pulzabilnosti (PI, pulsatility index) koji je mjera varijabilnosti brzina protoka krvi, i indeks rezistencije (RI, resistance index) kao odraz otpora protoku distalno od mjesta insonacije. Procjena cerebrovaskularne reaktivnosti (CVR) moguća je mjerenjem promjena brzina protoka krvi koje nastaju izlaganjem vazodilatacijskim poticajima kao što su inhalacija CO<sub>2</sub>,

zadržavanje daha ili primjena acetazolamida. (13) Test zadržavanja daha u kombinaciji s TCCD-om omogućuje metodu probira u realnom vremenu koja se dobro tolerira, a mjere se učinci endogenog CO<sub>2</sub> na moždanu cirkulaciju. Hiperkapnija uzrokuje vazodilataciju i povećanje protoka u moždanim krvnim žilama iz čijih se vrijednosti izračunava indeks zadržavanja daha (engl. breath holding index, BHI) kao pokazatelj CVR. (14-19)

#### 4. BIOMARKERI ENDOTELNE UPALE I DISFUNKCIJE

Biomarkeri endotelne upale i disfunkcije su bitni medijatori proupalnog okruženja i razvoja ateroskleroze koji pogoduju nastanku CVB. Pojačana aktivnost biomarkera upale potiče razvoj ateroskleroze neovisno o drugim čimbenicima rizika te tako u konačnici kompromitira moždanu cirkulaciju. Smatra se da infektivni čimbenici pridonose procesu kronične upale i ateroskleroze bilo direktnim djelovanjem na stanice krvnih žila ili neizravno, infekcijom koja ne pogađa direktno krvne žile, ali inducira citokine i reaktante akutne faze s posljedičnom akceleracijom ateroskleroze. (20, 21) U tom kontekstu razmatrani su brojni infektivni agensi (npr. *Chlamydomphila pneumoniae*, citomegalovirus, *Helicobacter pylori*, virus gripe, periodontalni patogeni) pa i HCV za kojeg se pretpostavlja da stimulira sintezu proinflamatornih citokina pogodujući proaterogenoj aktivnosti. (22)

E-selektin, intracelularna adhezijska molekula-1 (ICAM-1), vaskularna celularna adhezijska molekula-1 (VCAM-1) kao pokazatelji endotelne aktivacije te regulator angiogeneze vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF-A), se smatraju potencijalnim indikatorima endotelne disfunkcije, ateroskleroze pa i rizika cerebrovaskularne bolesti. Navedeni biomarkeri endotelne upale i disfunkcije su korišteni u brojnim istraživanjima ateroskleroze pa tako i u nekoliko studija kroničnog hepatitisa C, ali nikada u kombinaciji s procjenom cerebrovaskularne cirkulacije. (23-27)

# CILJEVI I HIPOTEZE

## 1. HIPOTEZE

- Ispitanici s kroničnim hepatitisom C imaju promijenjenu CVR u odnosu na zdrave ispitanike.
- Ispitanici s kroničnom HCV infekcijom razlikuju se od zdravih kontrola u razini markera endotelne disfunkcije.
- Razina markera endotelne disfunkcije korelira s BHI kao mjerom CVR.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Glavni cilj

- Usporediti CVR kao indikator rizika cerebrovaskularne bolesti u bolesnika s kroničnim hepatitisom C i u zdravih kontrola koristeći TCCD i metodu zadržavanja daha za određivanje BHI.

### 2.2. Sporedni ciljevi

- Usporediti vrijednosti brzina protoka krvi, izražene kao PI i RI, kroz srednju moždanu arteriju (eng. middle cerebral artery, MCA) u bolesnika s kroničnim hepatitisom C i u zdravih kontrola.
- Usporediti vrijednosti markera endotelne disfunkcije (VEGF-A, ICAM-1, sVCAM-1, E-selektin) u bolesnika s kroničnim hepatitisom C i zdravih kontrola te povezati ultrazvučne parametre cerebralne hemodinamike i vrijednosti markera endotelne disfunkcije.

# METODE I MATERIJALI

## 1. ISPITANICI

Provodili smo presječno, opservacijsko istraživanje prethodno odobreno od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split. Svi ispitanici su prije ulaska u studiju upoznati s detaljima istraživanja i ispunili informirani pristanak. Obuhvaćeno je 36 odraslih bijelaca, oba spola, dobi 27 do 42 godine koji su podijeljeni u dvije skupine: testnu (18 bolesnika s kroničnom HCV infekcijom) i kontrolnu skupinu (18 dobrovoljnih darivatelja krvi u kojih je isključena infekcija HCV-a). Kriteriji isključenja za obje skupine su bili: arterijska hipertenzija, šećerna bolest, ciroza jetara, cerebrovaskularna, hematološka bolest, kronična srčana ili maligna bolest u osobnoj anamnezi, prekomjerno konzumiranje alkohola (definirano s više od 7 alkoholnih pića na tjedan za žene i više od 14 za muškarce) te terapija hormonima, beta blokatorima, blokatorima kalcijevih kanala, antikoagulansima i vazodilatatorima. Zbog neadekvatne insonacije MCA kroz transtemporalni koštani prozor naknadno je isključen po jedan ispitanik iz svake skupine. Između navedenih skupina nije bilo statistički značajne razlike u sociodemografskim varijablama (dob, spol, težina, visina, BMI, konzumacija alkohola). Jedino je u drugom radu prevalencija pušenja bila veća u testnoj nego u kontrolnoj skupini (OR 9.1, 95% CI [1.64–55.10]). (19, 20)

## 2. UZORAK

U izračunu veličine uzorka kao glavnu mjeru ishoda koristili smo BHI. Vrijednosti aritmetičke sredine (1.00) i standardne devijacije (0.35) BHI procijenili smo za kontrolnu skupinu iz pilot studije provedene na 10 ispitanika. Iste smo parametre procijenili na 16 ispitanika s hepatitisom C: aritmetička sredina 0.68 i standardna devijacija 0.43, također iz pilot studije. Uz pretpostavku o snazi studije od 80%, vjerojatnosti greške tipa I od 5%, te omjeru veličina skupina od 1.6, minimalna očekivana veličina uzorka za detekciju 30% razlike BHI u skupini s hepatitisom C iznosila je 18 ispitanika u kontrolnoj i 29 ispitanika u skupini s HCV-om. Međutim, preliminarna analiza provedena neposredno nakon završetka pilot studije pokazala je da je nakon provođenja neparametrijskog Mann-Whitney testa ipak utvrđena značajna razlika između skupina u BHI ( $P=0.045$ ) pri čemu je medijan vrijednosti obe skupine ukazivao na čak 50% razliku u vrijednostima BHI. Stoga je daljnja analiza

provedena na početnom uzorku budući da je mogućnost greške tipa II na BHI indeksu uklonjena utvrđivanjem statistički značajne razlike.

### 3. METODE

Sva TCCD mjerenja su rađena na Acuson X500 ultrazvučnom aparatu (Siemens, Erlangen, Njemačka) s P4-2 sondom (frekvencije 2-4 MHz). Ispitivanja su provedena u poslijepodnevnom satima u tihoj prostoriji, na ispitanicima u ležećem položaju na leđima, nakon 5 minuta odmora. Svim ispitanicima je izmjerena krvni tlak, a potom je učinjen ultrazvučni pregled arterija dominantne strane Willisovog kruga insonacijom kroz temporalni koštani prozor standardnim protokolom, s tim da je poseban naglasak bio na MCA. Nad MCA su mjereni: vršna sistolička brzina (PS), krajnja dijastolička brzina (ED), RI i PI. Inicijalna mjerenja su učinjena u mirovanju. Potom, nakon normalnog udisaja, ispitanicima je rečeno da zadrže dah koliko mogu izdržati. Srednja brzina protoka kroz MCA ( $V_{\text{mean}}$ ) je kontinuirano monitorirana tijekom zadržavanja daha i na kraju procedure. Srednja brzina na kraju zadržavanja daha označena je kao  $V_{\text{max}}$ . Svim ispitanicima je bilježeno i vrijeme zadržavanja daha koje je korišteno u daljnjim izračunima. Cijeli postupak zadržavanja daha i mjerenja su ponovljeni nakon tri do četiri minute odmora te su izračunate srednje vrijednosti svake varijable iz oba mjerenja. CVR je određena izračunavanjem BHI iz omjera postotka porasta  $V_{\text{mean}}$  tijekom testa zadržavanja daha i trajanja zadržavanja daha (u sekundama). Opisana procedura je ranije korištena u brojnim studijama. (13-20)

### 4. MATERIJALI

Svim ispitanicima je venepunkcijom u Klinici za infektologiju uziman uzorak krvi iz kojeg su u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog Centra Split određeni markeri endotelne disfunkcije. Krv je skupljena u serumske epruvete i potom centrifugirana. Alikvoti seruma su pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize. Kvantitativna detekcija VEGF-A, ICAM-1, sVCAM-1 i E-selektina je mjerena imunoenzimskim (ELISA) testovima (Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue Waltham, MA USA) za kvantitativnu detekciju

navedenih markera. Prije ultrazvučnih mjerenja svim bolesnicima su ispunjeni upitnici s osnovnim demografskim i anamnestičkim podacima.

## 5. STATISTIČKA OBRADA

Podatci su pod šifrom ispitanika uneseni u elektroničke tablice i analizirani. Statistička analiza je rađena računalnim programom SPSS (verzija 16.0, Chicago, Illinois, a za drugi dio istraživanja verzija 24.0; Chicago, Illinois). Korišteni su Fisherov egzaktni i Mann-Whitney U test za deskriptivnu statistiku. Friedmanov test je korišten u procjeni razlike u tijeku parametara izmjerenih u ispitanika u 3 različita vremenska perioda testa zadržavanja daha. Korišteni su višestruki linearni regresijski modeli razine endotelnih markera u odnosu na hepatitis grupu i pušenje kao nezavisne varijable kako bi se utvrdilo je li uočena razlika razine endotelnih markera između grupa neovisna o pušačkom statusu. Za određivanje korelacije između BHI i endotelnih markera izračunat je Pearsonov korelacijski koeficijent. Statistička značajnost je postavljena na 0.05.

## REZULTATI

### 1. REZULTATI PRVOG RADA

U prvom radu, u kojem su obrađeni rezultati ultrazvučnih mjerenja, u mirovanju između dvije testirane skupine nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima PS, ED i  $V_{\text{mean}}$ , kao ni u RI i PI. (19) Također, nije bilo ni statistički značajne razlike u prosječnom vremenu zadržavanja daha. Ispitanici skupine s hepatitisom u odnosu na kontrole su na početku procesa zadržavanja daha imali značajno niže prosječne vrijednosti PS ( $AvPS_{\text{start}}$ ) ( $P = 0.018$ ), ED ( $AvED_{\text{start}}$ ) ( $P = 0.031$ ) i srednje brzine ( $Av_{\text{mean}}V_{\text{start}}$ ) ( $P = 0.02$ ), i također vrijednosti PS ( $AvPS_{\text{max}}$ ) ( $P = 0.02$ ) na kraju testa zadržavanja daha. BHI je bio značajno niži u hepatitis grupi. (Tablica 1)

Tablica 1. Rezultati TCCD mjerenja u mirovanju i tijekom testa zadržavanja daha kod skupine ispitanika s hepatitisom C i kontrolne skupine

Varijable (mjerna jedinica)	Hepatitis C, N=16		Kontrola, N=10		P vrijednost*
	Medijan	(IQR)	Medijan	(IQR)	
Sist (mmHg)	127.5	(120-130)	127.5	(120.00-131.25)	0.913
Dijast (mmHg)	77.5	(70-80)	75	(65.00-82.50)	0.807
RIrest (cm/s)	0.52	(0.49-0.55)	0.535	(0.49-0.60)	0.302
PIrest (cm/s)	0.76	(0.69-0.87)	0.85	(0.69-0.98)	0.187
PSrest (cm/s)	105.9	(88.40-131.23)	128.45	(111.98-148.78)	0.073
EDrest (cm/s)	49.8	(44.85-65.38)	57.05	(49.35-67.05)	0.246
S/Drest (cm/s)	2.085	(1.97-2.23)	2.155	(1.97-2.50)	0.329
$V_{\text{mean}}$ rest (cm/s)	71.15	(59.63-92.63)	81.65	(72.60-95.45)	0.188
$AvTBH$ (s)	37.00	(28.50-45.13)	27.50	(25.88-38.50)	0.292
$AvRI_{\text{start}}$	0.51	(0.48-0.55)	0.49	(0.46-0.56)	0.509
$AvPI_{\text{start}}$	0.74	(0.68-0.84)	0.76	(0.67-0.84)	0.932
$AvPS_{\text{start}}$ (cm/s)	99.83	(79.26-115.85)	132.48	(118.50-140.95)	0.018†
$AvED_{\text{start}}$ (cm/s)	48.50	(39.64-59.48)	61.98	(53.35-70.30)	0.031†
$AvS/D_{\text{start}}$ (cm/s)	2.04	(1.94 – 2.22)	1.97	(1.87-2.25)	0.477
$AvV_{\text{mean}}$ start (cm/s)	71.10	(55.03-76.05)	85.73	(80.58-95.74)	0.02†



AvRI <sub>max</sub>	0.45	(0.39-0.48)	0.46	(0.42-0.54)	0.492
AvPI <sub>max</sub>	0.60	(0.50-0.67)	0.63	(0.54-0.79)	0.46
AvPS <sub>max</sub> (cm/s)	119.85	(97.13-158.08)	163.30	(137.29-171.60)	0.02 <sup>†</sup>
AvED <sub>max</sub> (cm/s)	74.73	(50.58-86.49)	79.05	(73.84-94.50)	0.155
AvS/D <sub>max</sub> (cm/s)	1.81	(1.64-1.94)	1.85	(1.73-2.15)	0.527
AvV <sub>mean</sub> max (cm/s)	93.78	(69.34-119.70)	110.25	(100.13-123.64)	0.065
BHI	0.51	(0.48-0.55)	0.968979	(0.67-1.37)	0.045 <sup>†</sup>

Legenda:

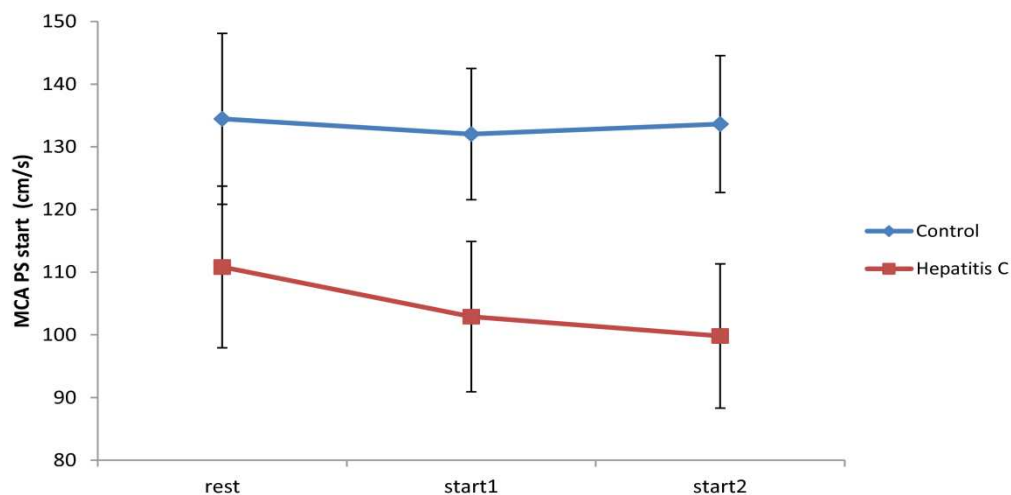
\* Mann-Whitney U test; <sup>†</sup> Značajnost postavljena na 0.05.

Sist – sistolički krvni tlak u mirovanju, Dijast – dijastolički krvni tlak u mirovanju, RI<sub>rest</sub> – RI u mirovanju, PI<sub>rest</sub> – PI u mirovanju, PS<sub>rest</sub> – PS brzina u mirovanju, ED<sub>rest</sub> – ED brzina u mirovanju, S/D<sub>rest</sub> – sistoličko/dijastolički omjer u mirovanju, V<sub>mean rest</sub> – srednja brzina u mirovanju, AvTBH - prosječno vrijeme zadržavanja daha, AvRI<sub>start</sub> – prosječni RI na početku zadržavanja daha, AvPI<sub>start</sub> – prosječni PI na početku zadržavanja daha, AvPS<sub>start</sub> – prosječna PS brzina na početku zadržavanja daha, AvED<sub>start</sub> – prosječna ED brzina na početku zadržavanja daha, AvS/D<sub>start</sub> – prosječni sistoličko-dijastolički omjer na početku zadržavanja daha, Av V<sub>mean start</sub> – prosječna srednja brzina na početku zadržavanja daha, AvRI<sub>max</sub> – prosječni RI na kraju zadržavanja daha, AvPI<sub>max</sub> – prosječni PI na kraju zadržavanja daha, AvPS<sub>max</sub> – prosječna PS brzina na kraju zadržavanja daha, AvED<sub>max</sub> – prosječna ED brzina na kraju zadržavanja daha, AvS/D<sub>max</sub> – prosječni sistoličko/dijastolički omjer na kraju zadržavanja daha, Av V<sub>mean max</sub> – prosječna srednja brzina na kraju zadržavanja daha;

### 1.1. PS brzina na početku zadržavanja daha (PS<sub>start</sub>)

U kontrolnoj skupini vrijednost PS u mirovanju nije se značajno razlikovala od vrijednosti dobivenih na početku dva uzastopna testa zadržavanja daha (PS<sub>start1</sub> i PS<sub>start2</sub>) (Friedmanov test, P = 0.459). Nasuprot tome, u skupini s hepatitisom C je nađen značajan pad vrijednosti PS<sub>start</sub> tijekom testa zadržavanja daha (Friedmanov test, P = 0.002). Post-hoc analize su pokazale da ova značajnost proizlazi primarno iz izrazitog pada vrijednosti PS<sub>start2</sub> brzine (post hoc test, P = 0.001). (Slika 1)

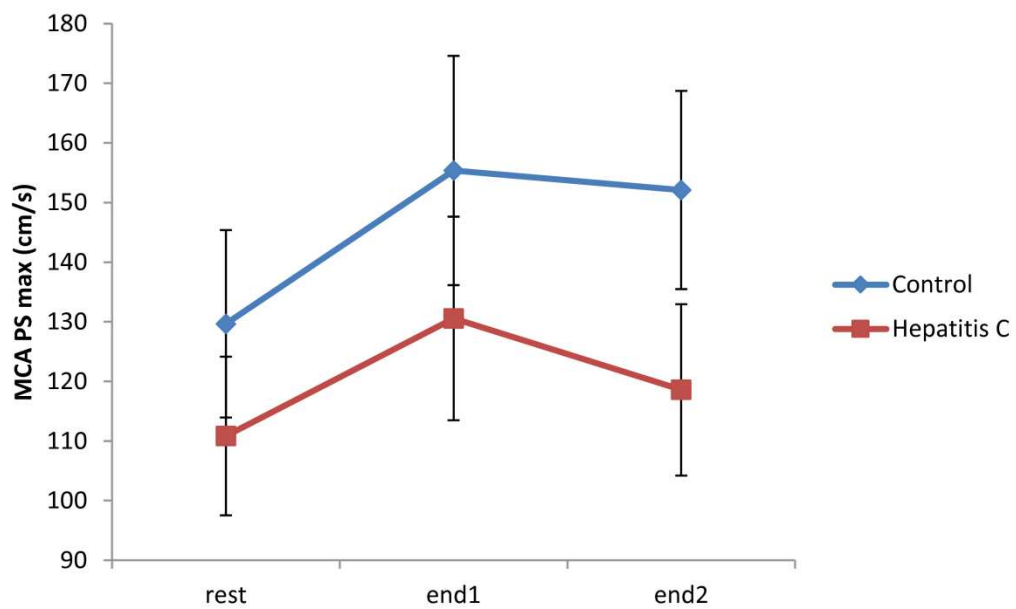
Slika 1. Promjene vršne sistoličke brzine u mirovanju ( $PS_{rest}$ ) i na početku dva uzastopna testa zadržavanja daha ( $PS_{start1}$  i  $PS_{start2}$ ).



## 1.2. PS brzina na kraju testa zadržavanja daha ( $PS_{max}$ )

Friedmanov test je korišten za utvrđivanje razlike  $PS_{max}$  između mirovanja (rest) i dva uzastopna testa zadržavanja daha.  $PS_{max}$  tijekom dva uzastopna testa zadržavanja daha su se značajno povisile u odnosu na brzine u mirovanju u obje ispitivane skupine ( $P < 0.002$  za obje usporedbe), s  $P < 0.016$  za kontrolnu skupinu (post hoc testovi). S druge strane, vrijednosti  $PS_{max}$  skupine s hepatitisom u prvom zadržavanju daha su bile značajno više nego u ostalim mjerenjima (post hoc,  $P = 0.001$ ), dok su vrijednosti  $PS_{max}$  u drugom postupku zadržavanja daha bile usporedive s  $PS_{max}$  u ostalim mjerenjima (post hoc,  $P = 0.335$ ). (Slika 2)

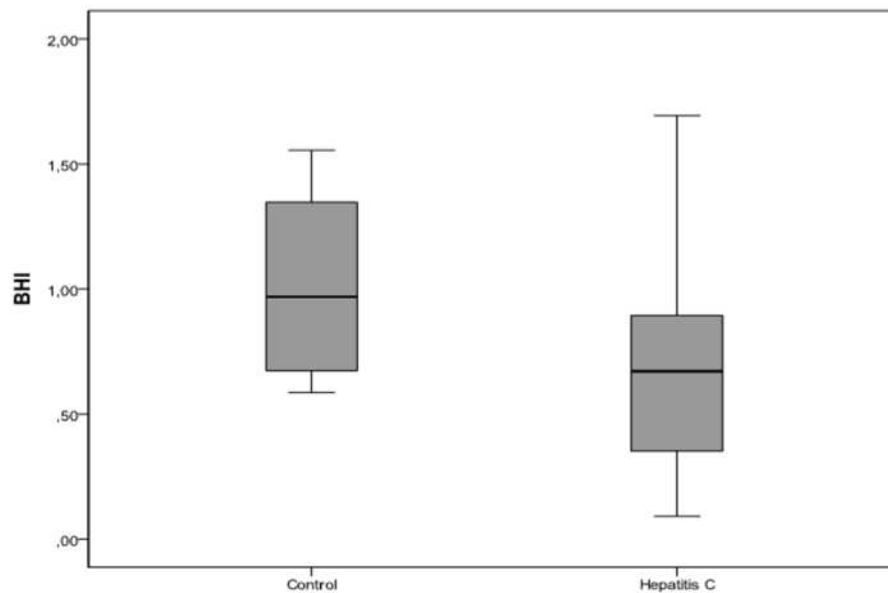
Slika 2. Promjene  $PS_{max}$  brzina u mirovanju (rest) i na kraju dva uzastopna testa zadržavanja daha (end1 i end2).



### 1.3. Indeks zadržavanja daha (BHI)

Izračunate vrijednosti BHI su bile značajno niže u HCV skupini nego kod zdravih kontrola ( $P = 0.045$ ). (Slika 3)

*Slika 3.* Distribucija BHI vrijednosti u skupini s hepatitisom i kontrolnoj skupini.



## 2. REZULTATI DRUGOG RADA

Markeri endotelne disfunkcije i BHI kod ispitanika s hepatitisom i kontrolnoj skupini su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Endotelni markeri i BHI u ispitanika s hepatitisom i kontrolnoj skupini

	Kontrolna	Hepatitis	P-vrijednost	Razlika‡
VEGF-A [pg/ml]	928 ± 390 <sup>§</sup>	620 ± 260 <sup>§</sup>	0.009*	308 (95% CI 84, 533)
ICAM-1 [ng/ml]	351 (133) <sup>  </sup>	535 (221) <sup>  </sup>	<0.001†	-168 (95% CI -262, -89)
sVCAM-1 [ng/ml]	805 (245) <sup>  </sup>	1027 (647) <sup>  </sup>	0.002†	-258 (95% CI -497, -116)
E-selektin [ng/ml]	69.1 ± 23.3 <sup>§</sup>	85.4 ± 39.6 <sup>§</sup>	0.145*	-16.3 (95% CI -38.4, 5.9)
BHI	1.10 ± 0.39 <sup>§</sup>	0.64 ± 0.44 <sup>§</sup>	0.005*	0.50 (95% CI 0.20, 0.80)

\* - T-test za nezavisne uzorke, † - Mann-Whitney U test za nezavisne uzorke, ‡ - razlika aritmetičke sredine ili medijane vrijednosti, § - sredina ± standardna devijacija, || - medijan (interkvartilni raspon)

Nađene su značajne razlike između skupina u razini svih markera osim E-selektina. U ispitanika s hepatitisom su vrijednosti ICAM-1 i sVCAM-1 bile značajno više, dok su vrijednosti VEGF-A bile značajno niže nego u kontrolnoj skupini. Verificirane razlike u razini endotelnih markera su ostale značajne čak i nakon korekcije za pušenje (regresijski modeli; P < 0.020 za ICAM-1, sVCAM-1 i VEGF-A). (Tablica 3)

Tablica 3. Razine endotelnih markera prilagođene za pušenje

	Nestandardizirani koeficijenti B	95% Interval pouzdanosti za B		P- vrijednost
		Donja granica	Gornja granica	
<b>VEGF-A (pg/ml)</b>				
Pušenje	19.102	-244.920	283.125	0.884
hepatitis C	-317.913	-581.528	-54.298	0.020
<b>ICAM-1 (ng/ml)</b>				
Pušenje	25.215	-65.681	116.111	0.576
hepatitis C	169.386	78.631	260.142	0.001
<b>sVCAM-1 (ng/ml)</b>				
Pušenje	-480.984	-1.086.514	124.546	0.116
hepatitis C	844.065	239.471	1.448.660	0.008
<b>E-selektin (ng/ml)</b>				
Pušenje	8.202	-17.493	33.897	0.521
hepatitis C	12.151	-13.505	37.807	0.342
<b>BHI</b>				
Pušenje	.085	-.272	.442	.629
hepatitis C	-.502	-.859	-.145	.008

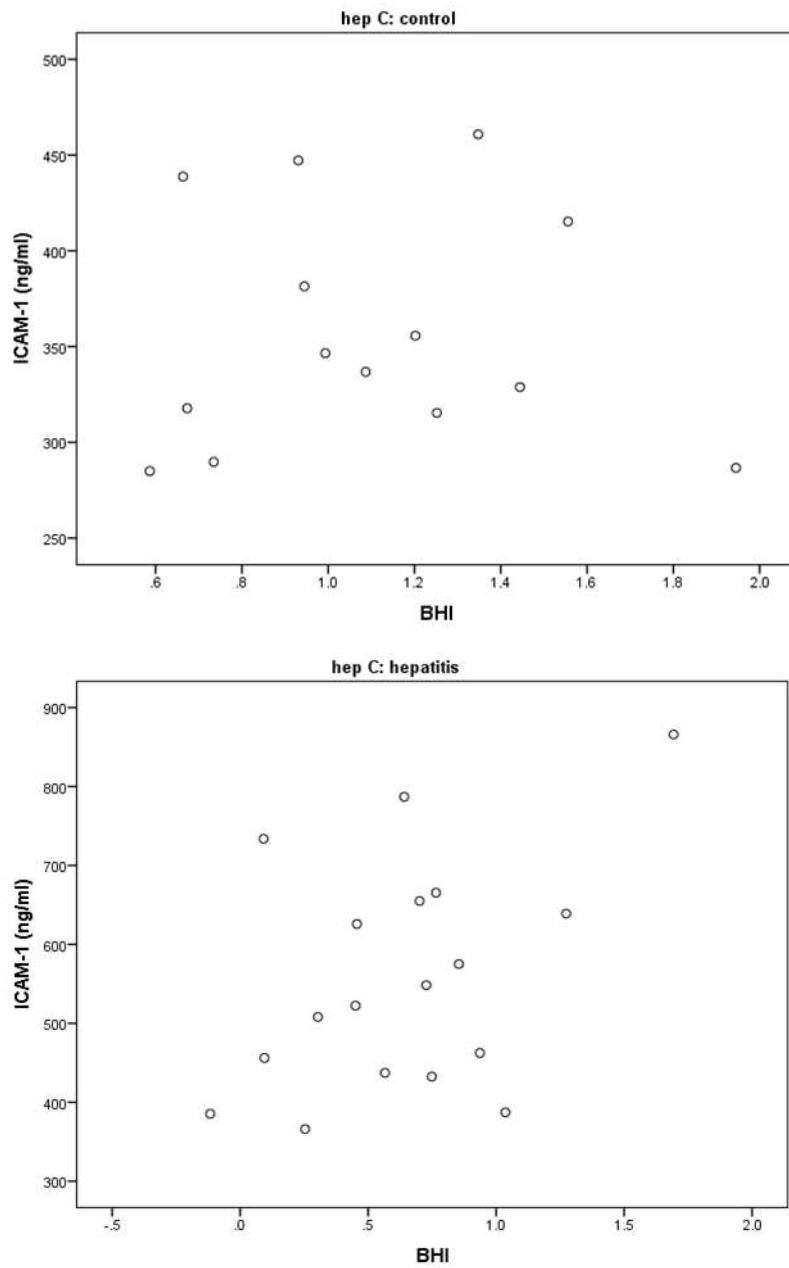
Značajno niže prosječne vrijednosti BHI su dobivene u skupini s hepatitisom (prosječni BHI 0.64) nego kontrolnoj skupini (prosječni BHI 1.10) (Tablica 3). U nijednoj skupini nije dokazana statistički značajna povezanost BHI i pojedinih endotelnih markera (Tablica 4). (20)

Tablica 4. Povezanost BHI i razine endotelnih markera u testiranim skupinama

			VEGF- A (pg/ml)	ICAM- 1 (ng/ml)	sVCAM -1 (ng/ml)	E- selektin (ng/ml)
Kontrolna	Pearsonova korelacija		-0.043	0.005	-0.054	0.070
	95% Interval pouzdanosti	Gornji	-0.506	-0.583	-0.451	-0.539
		Donji	0.488	0.619	0.391	0.567
	P-vrijednost		0.884	0.986	0.856	0.813
	N		14	14	14	14
Hepatitis	Pearsonova korelacija		0.085	0.430	0.103	0.284
	95% Interval pouzdanosti	Donji	-0.254	-0.262	-0.194	-0.342
		Gornji	0.429	0.799	0.619	0.705
	Značajnost (2-smjerno)		0.737	0.075	0.684	0.254
	N		18	18	18	18

Unatoč gore navedenom, dijagram raspršenosti za ICAM-1 u odnosu na BHI sugerira moguću povezanost u skupini s kroničnim hepatitisom. Međutim, zbog malog broja ispitanika uzorak dijagrama nije jasan i može reflektirati lažno pozitivan nalaz (Slika 4).

Slika 4. Dijagram raspršenosti ICAM-1 u odnosu na BHI u hepatitis i kontrolnoj skupini





## RASPRAVA

Do sada nisu objavljena slična istraživanja bolesnika s kroničnim hepatitisom C u kojima su korištene provokacijske metode zadržavanja daha radi ultrazvučne procjene reaktivnosti moždanih krvnih žila. Prethodne studije su pokazale da se redukcija krvožilne prilagodljivosti manifestira redukcijom vazodilatacijskog kapaciteta cerebralnih arterija, stanja koje prethodi razvoju CVB. (16, 17, 28, 29)

U našem istraživanju u mirovanju nisu nađene značajne razlike u parametrima cerebrovaskularnog protoka između bolesnika s HCV-om i zdravih kontrola, ali su bolesnici s HCV infekcijom na početku zadržavanja daha imali značajno niže vrijednosti  $AvPS_{start}$ ,  $AvED_{start}$  i  $AvV_{mean\ start}$  u odnosu na kontrole. (Tablica 1) Također su imali niže prosječne vrijednosti vršne sistoličke brzine ( $AvPS_{max}$ ) na kraju zadržavanja daha kao i niži BHI u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom. (Slika 3)

U odnosu na ultrazvučna mjerenja u mirovanju nađeno je značajno usporavanje prosječne  $PS_{start}$  brzine, osobito tijekom drugog postupka zadržavanja daha što je i glavni izvor ove razlike. (Slika 1) Slični rezultati su dobiveni mjerenjem prosječne  $PS_{max}$  brzine na kraju zadržavanja daha. Iako su obje skupine pokazale značajne promjene  $PS_{max}$  ( $P < 0.002$ , za obje usporedbe), ipak u kontrolnoj skupini  $PS_{max}$  su bile značajno više tijekom zadržavanja daha u odnosu na  $PS_{rest}$  registrirane u mirovanju. Za istaknuti je da su u skupini s hepatitisom PS bile značajno više u prvom postupku zadržavanja daha ( $PS_{max}$ ) u odnosu na odmor ( $PS_{rest}$ ), dok su u drugom zadržavanju daha bile slične vrijednostima u mirovanju. (Slika 2) Navedeni rezultati idu u prilog pretpostavljenoj promijenjenoj sposobnosti adaptacije intrakranijskih krvnih žila u bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Razlike ultrazvučnih parametara između dvije skupine u našoj studiji proizlaze većinom iz slabijeg odgovora ispitanika s hepatitisom na hiperkapniju u drugom postupku zadržavanja daha, moguće uslijed iscrpljenja cerebralnih krvnih žila i nemogućnosti da se prilagode povećanim metaboličkim zahtjevima.

Kao što je već navedeno u uvodu, CVB su heterogene etiologije, a uz od ranije poznate faktore rizika sve češće se spominju različite akutne i kronične infekcije koje različitim, i do sada nepotpuno razjašnjenim mehanizmima, pridonose aterosklerozi. Točan patogenetski mehanizam kojim HCV dovodi do ateroskleroze nije temeljito istražen. Vjerojatno kronična infekcija potiče prolongirani sistemski upalni odgovor koji dovodi do oštećenja endotela krvnih žila s posljedičnim razvojem aterosklerotskog plaka koji raste i destabilizira se. (30, 31) Iako većina objavljenih istraživanja povezuje kroničnu HCV infekciju s povećanim

rizikom CVB (22, 32, 33) postoje i ona koje ovu povezanost dovode u pitanje te je još uvijek potreban oprez u interpretaciji njihovih rezultata. (34) Adinolfi i sur. su našli veću prevalenciju HCV infekcije u bolesnika s moždanim udarom nego u kontrolnoj skupini bez moždanog udara (26.8% vs 6.6%,  $P = 0.0001$ ). Osim toga HCV bolesnici koji su razvili moždani udar su bili mlađi i s manje klasičnih rizičnih faktora u odnosu na HCV-negativne bolesnike. (32) Sorrentino i sur., kao i Targher i sur. su se bavili promjenama očne, odnosno karotidne cirkulacije kod bolesnika s hepatitisom C, ali u oba ova istraživanja većina ispitanika je imala cirozu jetara. (35, 36) Obzirom da je uznapredovala jetrena fibroza, neovisno o etiologiji, karakterizirana hemodinamskim promjenama, bolesnici s cirozom nisu bili uključeni u naše istraživanje.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na smanjenu CVR procijenjenu kroz BHI u bolesnika s kroničnim hepatitisom C. (19) Opisani negativni učinci na cerebrovaskularnu cirkulaciju mogu barem dijelom doprinijeti povećanom riziku od CVB u bolesnika s HCV-om. Rezultati ultrazvučnih mjerenja su potvrđeni i u drugom radu u kojem su još procijenjeni i biljezi endotelne disfunkcije. (20) Bolesnici s kroničnim hepatitisom C su imali značajno više koncentracije ICAM-1 i sVCAM-1 u usporedbi s kontrolama što je usporedivo s većinom do sada objavljenih studija koje su se bavile HCV-om, endotelnom disfunkcijom i povećanim rizikom CVB. (37-39) Autori nekih recentnih istraživanja su išli i korak dalje tvrdeći da uspješno liječenje kroničnog hepatitisa C novim DAA poništava nepovoljne učinke HCV-a s posljedičnim poboljšanjem funkcije endotela. (40-42)

U našem istraživanju HCV ispitanici su imali niže vrijednosti VEGF-A u odnosu na zdrave kontrole što je u suprotnosti s nekoliko prethodnih radova koji su povezali više vrijednosti VEGF-A s povećanim rizikom ishemijske CVB. (43) Salum i sur. su u bolesnika s kroničnim hepatitisom C i uznapredovalom fibrozom jetara dobili najizrazitije povišenje vrijednosti VEGF-A u odnosu na zdrave kontrole. (44) Činjenica da bolesnici s cirozom nisu bili uključeni u naše istraživanje vjerojatno je razlog oprečnih rezultata u odnosu na neke ranije studije i nižih vrijednosti VEGF-A, odnosno usporedivih vrijednosti E-selektina u dvije testirane skupine. Isto tako je moguće da koncentracija ovih biomarkera nije relevantna u kontekstu HCV-a kao nezavisnog čimbenika rizika za razvoj CVB te da je njihova razina ipak više vezana uz progresiju jetrene fibroze neovisno o etiologiji. (45, 46)

Iako smo u drugom radu potvrdili razlike ultrazvučnih parametara između ispitanika s hepatitisom C i kontrola, kao i krvnih biljega endotelne disfunkcije, cilj je bio kombinirati ove dvije metode u kontekstu kronične HCV infekcije i procjene rizika CVB što prema našim

saznanjima nije učinjeno u do sada objavljenim istraživanjima. U kontrolnoj skupini nije bilo značajne povezanosti BHI i endotelnih biljega. Ipak, u HCV skupini postoje naznake umjerene povezanosti BHI s ICAM-1 te se nameće potreba daljnjih istraživanja s većim brojem ispitanika, uključujući i one kod kojih je provedeno liječenje DAA. (Slika 4)

Iako je fokus ove disertacije na promjenama moždane cirkulacije pretpostavljamo da opisane promjene ipak reflektiraju sistemske poremećaje krvožilnog sustava prije nego izoliranu cerebrovaskularnu disfunkciju te bi u tom smislu bilo uputno u budućim istraživanjima koristiti i etablirane metode procjene periferne vaskularne endotelne funkcije poput ultrazvučnog testa protokom posredovane dilatacije perifernih arterija (FMD; engl. flow mediated dilatation) i periferne arterijske tonometrije.

Činjenica da bolesnici s cirozom nisu bili uključeni, a dobivene su značajne razlike CVR-a i biljega endotelne disfunkcije, dodatno nameće potrebu aktivne, rane dijagnoze i liječenja HCV bolesnika, osobito danas s dostupnim visoko učinkovitim DAA. Na taj način spriječila bi se ne samo progresija jetrenog oštećenja već i moguća sistemska ateroskleroza potaknuta kroničnom upalom.

## ZAKLJUČAK

Rezultati doktorske disertacije ukazuju na smanjenu CVR u bolesnika s kroničnim hepatitisom C, a koja je procijenjena jednostavnom i neinvazivnom primjenom TCCD-a u postupku zadržavanja daha. Opisani negativni efekt na cerebrovaskularnu hemodinamiku može pridonijeti povećanom riziku CVB. Pruženi su dodatni dokazi povezanosti biljega endotelne disfunkcije i povišenog rizika CVB kod bolesnika s HCV-om. Potrebne su daljnje studije s većim brojem ispitanika koje bi uključile i one bolesnike u kojih je provedeno uspješno liječenje DAA kako bi se procijenilo učinak antivirusne terapije na CVR i biljege endotelne disfunkcije. Ovakva istraživanja također bi mogla dati odgovor na mogućnost kombinirane primjene BHI i barem jednog od biljega endotelne disfunkcije u svrhu procjene rizika CVB u bolesnika s kroničnim hepatitisom C.

## KRATKI SAŽETAK

**Uvod:** Kronična HCV infekcija je povezana sa sistemskim upalnim odgovorom i metaboličkim komplikacijama koje mogu pogodovati razvoju ateroskleroze i većem riziku od cerebrovaskularne bolesti (CVB).

**Cilj:** Cilj ove disertacije bio je procijeniti cerebrovaskularnu reaktivnosti (CVR) u bolesnika s kroničnim hepatitisom C te odrediti serumske razine E-selektina, VCAM-1, ICAM-1 i VEGF-A i njihovu korelaciju s CVR.

**Metode:** Ispitanicima s kroničnim hepatitisom C, kao i zdravim kontrolama učinjena je procjena CVR sukladno etabliranom testu zadržavanja daha koji koristi transkranijски color Doppler (TCCD) za mjerenje brzina protoka krvi i indeksa zadržavanja daha (BHI). Uzet je uzorak krvi ispitanicima u hepatitis i kontrolnoj skupini radi analize biljega endotelne disfunkcije i njihove korelacije s CVR procijenjene kroz ultrazvučno određen BHI.

**Rezultati:** Rezultati dobiveni tijekom zadržavanja daha su otkrili značajno niže vrijednosti prosječne vršne sistoličke brzine (AvPS start,  $P = 0.018$ ), krajnje dijastoličke (AvED start,  $P = 0.031$ ), srednje brzine na samom početku postupka zadržavanja daha (AvmeanV start,  $P = 0.02$ ), kao i niže srednje vršne sistoličke brzine na kraju zadržavanja daha (AvPS max,  $P = 0.02$ ) u hepatitis skupini. Vrijednosti CVR, procijenjene kroz BHI, su bile također značajno niže ( $P = 0.045$ ) u HCV ispitanika. Dobivene su značajne razlike između testiranih skupina u svim endotelnim markerima izuzev E-selektina. Dok su ICAM-1 i sVCAM-1 bili značajno viši u hepatitis skupini, VEGF-A je bio značajno niži. Nije nađena značajna povezanost između BHI i bilo kojeg od biljega endotelne disfunkcije u kontrolnoj skupini, dok u skupini s hepatitisom dijagram rasapa ICAM-1 u odnosu na BHI sugerira moguću povezanost.

**Zaključak:** Rezultati ove disertacije potvrđuju povezanost kroničnog hepatitisa C s promijenjenom CVR i povišenim biljezima endotelne aktivacije (ICAM-1, VCAM-1) kao mogućim indikatorima povećanog rizika od cerebrovaskularne bolesti u bolesnika s HCV-om.

## SHORT ABSTRACT

### **Title: Evaluation of cerebrovascular reactivity and markers of endothelial dysfunction in patients with chronic hepatitis C infection**

**Background:** Hepatitis C viral (HCV) infection is associated with systemic inflammation and metabolic complications that might predispose patients to atherosclerosis and increased risk of ischemic cerebrovascular disease.

**Aim:** This doctoral thesis is aimed to assess cerebrovascular reactivity (CVR) in patients with chronic hepatitis C, and also to determine E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 and VEGF-A serum levels in patients with chronic HCV infection in order to correlate them with CVR.

**Methods:** Patients with chronic hepatitis C infection, as well as healthy blood donors in the control group, were assessed for CVR according to the well-established breath-holding test that uses the transcranial color Doppler (TCCD) for measurement of blood flow velocity and breath-holding index (BHI). A blood sample was taken from examinees in both groups to assess markers of endothelial dysfunction and to correlate them with CVR that was expressed as BHI determined by TCCD.

**Results:** Results obtained during the breath-holding revealed significantly lower average peak systolic (AvPS start,  $P = 0.018$ ), end-diastolic (AvED start,  $P = 0.031$ ) and mean velocity values at the very beginning of the breath-holding procedure (AvmeanV start,  $P = 0.02$ ), as well as a lower mean peak systolic velocity at the end of the breath-holding test (AvPS max,  $P = 0.02$ ) in the hepatitis C group. CVR values, calculated as the BHI, were also significantly lower ( $P = 0.045$ ) in the hepatitis C group. The obtained results revealed significant differences between the groups in all endothelial markers with the exception of E selectin. While the ICAM-1 and sVCAM-1 were significantly increased in the hepatitis group, VEGF-A was significantly decreased. No significant association between the BHI and any of the endothelial markers was found in the control group, while in the hepatitis group the scatter plot of ICAM-1 vs BHI suggested possible association.

**Conclusions:** the results of this doctoral thesis confirm an association between a chronic HCV infection and altered CVR as well as higher levels of markers of endothelial activation (ICAM-1, VCAM-1) as possible indicators of an increased cerebrovascular disease risk.

## POPIS LITERATURE

1. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 22;19(1):23. doi: 10.3390/ijms19010023. PMID: 29271914; PMCID: PMC5795974.
2. Begovac, J. (2018). Virusni hepatitisi. U: Vince A.; *Klinička infektologija*. Zagreb: Medicinska naklada, str. 283-298.
3. Steffen G, Sperle I, Leendertz SA, Sarma N, Beermann S, Thamm R, et al. The epidemiology of Hepatitis B, C and D in Germany: A scoping review. *PLoS One.* 2020;15(3):e0229166. Published 2020 Mar 9. doi:10.1371/journal.pone.0229166
4. Rodger AJ, Roberts S, Lanigan A, Bowden S, Brown T, Crofts N. Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975. *Hepatology.* 2000 Sep;32(3):582-7. doi: 10.1053/jhep.2000.9714. PMID: 10960453.
5. Gumber SC, Chopra S. Hepatitis C: a multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann Intern Med* 1995; 123:615.
6. Iorga RA, Bacalbasa N, Bratu OG, Ionita Radu F, Diaconu CC. The impact of infection with hepatitis C virus on cardiovascular risk. *Am J Cardiovasc Dis.* 2020;10(3):201-206. Published 2020 Aug 15.
7. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol* 2017; 66:153.
8. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, Cao Y, El-Serag HB. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology.* 2017 Oct;153(4):996-1005.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.012. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28642197.
9. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MS. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res.* 2017;120(3):472-495. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308398
10. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868–874. <https://doi.org/10.1038/nature01323> PMID: 12490960

11. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Tooda E, Hashimoto H, Nagai R, et al. Association between hepatitis C virus seropositivity, carotid-artery plaque, and intima-media thickening. *Lancet* 2002; 359:133–135. PMID: 11809259
12. Liao CC, Su TC, Sung FC, Chou WH, Chen TL. Does hepatitis C virus infection increase risk for stroke? A population-based cohort study. *PLoS One*. 2012;7(2):e31527. doi:10.1371/journal.pone.0031527
13. Markus HS, Harrison MJG. Estimation of cerebrovascular reactivity using transcranial Doppler, including the use of breath-holding as the vasodilatory stimulus. *Stroke* 1992; 23: 668–673. PMID: 1579964
14. Alexandrov, A. V., Sloan, M. A., Tegeler, C. H., Newell, D. N., Lumsden, A. , Garami, Z. , et al. (2012), Practice Standards for Transcranial Doppler (TCD) Ultrasound. Part II. Clinical Indications and Expected Outcomes. *Journal of Neuroimaging*, 22: 215-224. doi:10.1111/j.1552-6569.2010.00523.
15. Matteis M, Troisi E, Monaldo BC, Caltagirone C, Silvestrini M. Age and sex differences in cerebral hemodynamics: a transcranial Doppler study. *Stroke* 1998; 29:963–967. PMID: 9596243
16. Silvestrini M, Troisi E, Matteis M, Cupini LM, Bernardi G. Effect of smoking on cerebrovascular reactivity. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16:746–749. <https://doi.org/10.1097/00004647-199607000-00027> PMID: 8964816
17. Silvestrini M, Troisi E, Matteis M, Cupini LM, Caltagirone C. Transcranial Doppler assessment of cerebrovascular reactivity in symptomatic and asymptomatic severe carotid stenosis. *Stroke* 1996; 27:1970–1973. PMID: 8898800
18. Settakis G, Lengyel A, Molnar C, Bereczki D, Csiba L, Fu"lesdi B. Transcranial Doppler study of cerebral hemodynamics changes during breath-holding and hyperventilation test. *J Neuroimaging* 2002; 12:252–258. PMID: 12116744
19. Pavicic Ivelja M, Ivic I, Dolic K, Mestrovic A, Perkovic N, Jankovic S. Evaluation of cerebrovascular reactivity in chronic hepatitis C patients using transcranial color Doppler. *PLoS One*. 2019 Jun 11;14(6):e0218206. doi: 10.1371/journal.pone.0218206. PMID: 31185040; PMCID: PMC6559645.
20. Pavicic Ivelja M, Dolic K, Tandara L, Perkovic N, Mestrovic A, Ivic I. 2021. Blood markers of endothelial dysfunction and their correlation to cerebrovascular reactivity in patients with chronic hepatitis C infection. *PeerJ* 9:e10723 <https://doi.org/10.7717/peerj.10723>



21. Campbell LA, Rosenfeld ME. Infection and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res*. 2015 Jul;46(5):339-50. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.05.006. Epub 2015 May 21. PMID: 26004263; PMCID: PMC4524506.
22. Huang H, Kang R, Zhao Z. 2014. Is hepatitis C associated with atherosclerotic burden? A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 9(9):e106376. DOI 10.1371/journal.pone.0106376.
23. Roed T, Kristoffersen US, Knudsen A, et al. Increased prevalence of coronary artery disease risk markers in patients with chronic hepatitis C--a cross-sectional study. *Vasc Health Risk Manag*. 2014;10:55–62. Published 2014 Jan 21. doi:10.2147/VHRM.S53557
24. Wiseman S, Marlborough F, Doubal F, Webb D, J, Wardlaw J: Blood Markers of Coagulation, Fibrinolysis, Endothelial Dysfunction and Inflammation in Lacunar Stroke versus Non-Lacunar Stroke and Non-Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis. *Cerebrovasc Dis* 2014;37:64-75. doi: 10.1159/000356789
25. Blann A, Kumar P, Krupinski J, McCollum C, Beevers DG, Lip GY. 1999. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 10(5):277-284 DOI 10.1097/00001721-199907000-00009.
26. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP. 1997. Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochirurgica Supplementum* 70:12–16 DOI 10.1007/978-3-7091-6837-0\_4.
27. Salum GM, Bader El Din NG, Ibrahim MK, Anany MA, Dawood RM, Khairy A, El Awady MK. 2017. Vascular endothelial growth factor expression in Hepatitis C virus-induced liver fibrosis: a potential biomarker. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 37(7):310–316 DOI 10.1089/jir.2016.0127
28. Zavoreo I, Demarin V. Breath holding index in evaluation of cerebral vasoreactivity. *Acta Clin Croat* 2004; 43:15–9.
29. Placidi F, Diomedi M, Cupini LM, Bernardi G, Silvestrini M. Impairment of daytime cerebrovascular reactivity in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *J Sleep Res* 1998; 7,288–292. PMID: 9844856
30. Rosenfeld ME, Campbell LA. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of

- atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011 Nov; 106(5):858–67. <https://doi.org/10.1160/TH11-06-0392> PMID: 22012133
31. Masia M, Padilla S, Robledano C, Ramos JM, Gutierrez F. Evaluation of endothelial function and subclinical atherosclerosis in association with hepatitis C virus in HIV-infected patients: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2011; 11:265. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-265> PMID: 21967471
  32. Adinolfi LE, Restivo L, Guerrera B, Sellitto A, Ciervo A, Iuliano N, et al. Chronic HCV infection is a risk factor of ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2013; 231:22–26. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis>. 2013.08.003 PMID: 24125405
  33. Adinolfi LE, Zampino R, Restivo L, Lonardo A, Guerrera B, Marrone A, et al. Chronic hepatitis C virus infection and atherosclerosis: Clinical impact and mechanisms. *World J Gastroenterol* 2014 Apr 7; 20 (13):3410–3417. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i13.3410> PMID: 24707124
  34. Younossi ZM, Stepanova M, Nader F, Younossi Z, Elsheikh E. Associations of chronic hepatitis C with metabolic and cardiac outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 647–652. <https://doi.org/10.1111/apt.12234> PMID: 23384408
  35. Sorrentino P, Tarantino G, Conca P, Ragucci P, Perrella A. Abnormally high resistive index of central retinal artery by ultrasound color Doppler in patients with viral chronic liver disease: correlation with worsening liver staging. *Ultrasound Med Biol* 2004 May; 30(5):599–604. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2004.02.011> PMID: 15183224
  36. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006 Jun(6):1325–30. <https://doi.org/10.2337/dc06-0135> PMID: 16732016
  37. Blann A, Kumar P, Krupinski J, McCollum C, Beevers DG, Lip GY. 1999. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 10(5):277-284
  38. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP. 1997. Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochirurgica Supplementum* 70:12-16

39. Martinic-Popovic I, Simundic AM, Dukic L, Lovrencic-Huzjan A, Popovic A, Seric V, Basic-Kes V, Demarin V. 2014. The association of inflammatory markers with cerebral vasoreactivity and carotid atherosclerosis in transient ischaemic attack. *Clinical Biochemistry* 47(16-17):182-186
40. Davis JS, Young M, Lennox S, Jones T, Piera K, Pickles R, Oakley S. 2018. The effect of curing hepatitis C with direct-acting antiviral treatment on endothelial function. *Antiviral Therapy* 23(8):687-69
41. Schmidt FP, Zimmermann T, Wenz T, Schnorbus B, Ostad MA, Feist C, Grambihler A, Schattenberg JM, Sprinzl MF, Münzel T+1 more. 2018. Interferon- and ribavirin-free therapy with new direct acting antivirals (DAA) for chronic hepatitis C improves vascular endothelial function. *International Journal of Cardiology* 271:296-300
42. Muñoz Hernández R, Ampuero J, Millán R, Gil-Gómez A, Rojas Á, Macher HC, Gallego-Durán R, Gato S, Montero-Vallejo R, Rico MC+5 more. 2020. Hepatitis C virus clearance by direct-acting antiviral agents improves endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis: HEPCAR study. *Clinical and Translational Gastroenterology* 11(8):e00203
43. Shoamanesh A, Preis SR, Beiser AS, Kase CS, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ, Seshadri S, Romero JR. 2016. Circulating biomarkers and incident ischemic stroke in the Framingham Offspring Study. *Neurology* 87(12):1206-1211
44. Salum GM, Bader El Din NG, Ibrahim MK, Anany MA, Dawood RM, Khairy A, El Awady MK. 2017. Vascular endothelial growth factor expression in Hepatitis C virus-induced liver fibrosis: a potential biomarker. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 37(7):310-316
45. Kaplanski G, Farnarier C, Payan MJ, Bongrand P, Durand JM. 1997. Increased levels of soluble adhesion molecules in the serum of patients with hepatitis C. Correlation with cytokine concentrations and liver inflammation and fibrosis. *Digestive Diseases and Sciences* 42(11):2277-2284
46. Montalto G, Giannitrapani L, Soresi M, Virruso L, Martino DD, Gambino R, Carroccio A, Cervello M. 2001. Circulating E-selectin levels in chronic hepatitis C patients with normal or elevated transaminase before and after alpha-interferon treatment. *Inflammation* 25(2):101-108

# ŽIVOTOPIS

MIRELA PAVIČIĆ IVELJA, DR. MED.

Curriculum vitae

Obrazovanje

1999-2005 dr. med. Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

Edukacije

2019 Polaznik, Poslijediplomski tečaj I. kategorije Ultrazvuk u kliničkoj medicini "ultrasonografska dijagnostika abdomena"

2019 Polaznik, Poslijediplomski tečaj I. kategorije „Ultrazvuk prsnog koša u djece“

2010-2016 Specijalizacija iz infektologije, KBC Split, Split

2008-2011 Polaznik, Poslijediplomski doktorski studij EBM, Klinička medicina utemeljena na dokazima, MEFST

2007 Edukacija, Transkranijски color Doppler, KB Sestre milosrdnice, Zagreb

Radno iskustvo

2016- Specijalist infektolog, KBC Split, Split

2010-2016 Specijalizacija iz infektologije, Klinika za infektologiju, KBC Split, Split

2007-2010 Znanstveni novak, Medicinska radiologija, MEFST, Split

Osobne vještine

Strani jezik: engleski - razina C1/C2

njemački - B2

Digitalne vještine - ECDL Start certifikat

Priznanja i nagrade

2004 Rektorova nagrada Sveučilišta u Splitu

## Članstva

- 2011- HDIB - Hrvatsko društvo za infektivne bolesti
- 2016- ESCMID - Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti
- 2019- izabrani zastupnik u Skuštini Hrvatske liječničke komore, HLK

## ZNANSTVENE PUBLIKACIJE:

1. Kovacic Z, **Marendic M**, Soljic M, Pecotic R, Kardum G, Dogas Z. Knowledge and attitude regarding sleep medicine of medical students and physicians in Split, Croatia. *Croat Med J.* 2002 Feb;43(1):71-4.
2. Jankovic S, **Pavicic Ivelja M**, Kolic K, Buca A, Dolic K, Lovric Kojundzic S, Caljkusic K, Bilic I, Capkun V. CT perfusion and noncontrast CT in acute ischemic stroke diagnosing- is there influence on early thrombolytic therapy outcome? *Coll Antropol.* 2010;34:1391-6.
3. Ivic I, Karanovic J, **Pavicic Ivelja M**. Sepsis with multiple abscesses caused by staphylococcus warneri: a case report. *Central European Journal of Medicine.* Feb 2013, Volume 8, pp 45-47;
4. **Pavicic Ivelja M**, Ivic I, Dolic K, Mestrovic A, Perkovic N, Jankovic S. Evaluation of cerebrovascular reactivity in chronic hepatitis C patients using transcranial color Doppler. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218206. Published 2019 Jun 11. doi:10.1371/journal.pone.0218206
5. Mestrovic A, Perkovic N, Bozic J, **Pavicic Ivelja M**, Vukovic J, Kardum G, Puljiz Z, Tonkic A. Randomised clinical trial comparing concomitant and hybrid therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *PLoS One.* 2020 Dec 30;15(12):e0244500. doi: 10.1371/journal.pone.0244500. PMID: 33378403; PMCID: PMC7773256.
6. **Pavicic Ivelja M**, Dolic K, Tandara L, Perkovic N, Mestrovic A, Ivic I. Blood markers of endothelial dysfunction and their correlation to cerebrovascular

reactivity in patients with chronic hepatitis C infection. PeerJ. 2021 Jan 14;9:e10723. doi: 10.7717/peerj.10723. PMID: 33520470; PMCID: PMC7811780.

Nastavni tekstovi (poglavlje u knjizi)

Bešenski N, Jankovic S, Buča A. Klinička neuroradiologija mozga. Koautor poglavlja „Infektivne i upalne bolesti mozga“. Medicinska naklada Zagreb. 2011.