



Wydział Lekarski
z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Dagmara Przekop

*Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego
wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby
w zakażeniu SARS-CoV-2*

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu
Medycznego w Białymstoku

Białystok 2022 r.

Promotor pracy doktorskiej:

prof. dr hab. Lech Chrostek

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

SPIS TREŚCI

1.	Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej	5
1.1.	Praca przeglądowa	5
1.2.	Praca oryginalna	5
2.	Wykaz skrótów	6
3.	Wprowadzenie	8
4.	Cel pracy	11
5.	Realizacja celów naukowych	12
5.1.	Materiał do badań	12
5.2.	Wyniki	13
5.2.1.	Ocena stopnia zwłóknienia wątroby	13
5.2.2.	Określenie nieinwazyjnych wskaźników zwłóknienia wątroby	14
5.2.3.	Ocena uszkodzenia wątroby w przebiegu COVID-19	16
5.2.4.	Metody statystyczne	16
5.3.	Omówienie wyników	17
5.3.1.	Ocena stopnia zwłóknienia wątroby przy pomocy nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby	17
5.3.2.	Wpływ zakażenia wirusem SARS-CoV-2 na wyniki badań laboratoryjnych	22
5.3.3.	Podsumowanie wyników badań	25
5.4.	Dyskusja	26
6.	Wnioski	34
7.	Literatura	35
8.	Streszczenie w języku polskim	46
9.	Streszczenie w języku angielskim/Summary	49
10.	Kopie publikacji wchodzących w cykl rozprawy doktorskiej	52
10.1.	Praca oryginalna	52
10.2.	Praca przeglądowa	65
11.	Zgoda komisji bioetycznej	76

12.	Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej	78
13.	Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej.....	80

1. WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1.1. Praca przeglądowa

Przekop D, Gruszewska E, Chrostek L. Liver function in COVID-19 infection. World Journal of Hepatology, 2021; 13(12): 1909-1918.

Punktacja IF: 3,173; MNiSW: 100

1.2. Praca oryginalna

Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, Golaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C. Journal of Clinical Medicine, 2021; 10(17):3951.

Punktacja IF: 4,242; MNiSW: 140

Rodzaj Publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej	2	7,415	240
Publikacje, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	1	2,276	70
Razem	3	9,691	310

2. WYKAZ SKRÓTÓW

ACE2	<i>angiotensin-converting enzyme 2</i> , enzym konwertujący angiotensynę 2
ALP	<i>alkaline phosphatase</i> , fosfataza alkaliczna
ALT	<i>alanine aminotransferase</i> , aminotransferaza alaninowa
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> , zespół ostrej niewydolności oddechowej
AST	<i>aspartate aminotransferase</i> , aminotransferaza asparaginianowa
COVID-19	<i>coronavirus disease</i> , ostra choroba zakaźna układu oddechowego wywołana zakażeniem wirusem SARS-CoV-2
CRP	<i>C-reactive protein</i> , białko C- reaktywne
DAA	<i>direct-acting antiviral agents</i> , środki przeciwwirusowe działające bezpośrednio
DSV	<i>dasabuvir</i> , dazabuwir
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , kwas wersenowy
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Europejska Agencja Leków
GGT	<i>γ-glutamyl transferase</i> , γ -glutamylotransferaza
IL	<i>interleukin</i> , interleukina

LDH	<i>lactate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza mleczanowa
LFT	<i>liver function tests</i> , testy czynnościowe wątroby
LSM	<i>liver stiffness measure</i> , miara sztywności wątroby
MCV	<i>mean corpuscular volume</i> , średnia objętość krwinki
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver diseases</i> , niealkoholowe stłuszczeniowe choroby wątroby
PEG INF + RBV	<i>pegylated interferon-α and ribavirin</i> , pegyłowany interferon- α i rybawiryna
PLT	<i>platelets</i> , płytki krwi
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> , reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą
SVR12	<i>sustained virologic response after 12 weeks of therapy</i> , trwała odpowiedź wirusologiczna po 12 tygodniach terapii
TBIL	<i>total bilirubin</i> , bilirubina całkowita
VCTE	<i>vibration-controlled transient elastography</i> , elastografia dynamiczna

3. WPROWADZENIE

Wirusowe zapalenie wątroby typu C (HCV) jest wywołane przez infekcję jednoniciowym, otoczkowym wirusem RNA z rodziny Flaviviridae, rodzaju Hepacivirus. Infekcja HCV powoduje schorzenia związane z uszkodzeniem wątroby (przewlekłe zapalenie wątroby, marskość wątroby, rak wątrobowokomórkowy) jak i objawy pozawątrobowe, np. krioglobulinemia mieszana [1]. Przyczyną szerokiego rozpowszechnienia zakażeń HCV jest bezobjawowy przebieg choroby, jak również drogi zakażenia.

Do zakażenia może dojść drogą krwiopochodną (ekspozycja zawodowa lub pozazawodowa), kontaktów seksualnych oraz drogą wertykalną. Brak odpowiedniej wiedzy i świadomości na temat konieczności testowania się oraz przeświadczenie, że problem nas nie dotyczy, skutkuje późnym i często przypadkowym rozpoznaniem [2]. Dzisiejsza medycyna oferuje skuteczne leczenie antyretrowirusowe zakażenia HCV, czego jeszcze kilka lat temu brakowało [3].

Zrewolucjonizowane w ostatnich latach leczenie WZW typu C polega na zastosowaniu preparatów o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (DAA). Eliminacja pierwotnego czynnika uszkadzającego umożliwia zahamowanie, jak również regresję choroby na pewnym etapie. Europejska Agencja Leków (EMA) zatwierdziła bezinterferonowy schemat leczenia 3D firmy AbbVie do leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C genotypu 1 i 4 [4]. Terapia bezinterferonowa polega na zastosowaniu trzech leków według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna (VDR). Po włączeniu leczenia schematem VDR, zwiększyła się trwała odpowiedź wirusologiczna (SVR) [5].

Niezwykle ważnym etapem podczas całego procesu opieki nad pacjentem zakażonym HCV, jest diagnostyka i odpowiednie monitorowanie. Przeszkórna

biopsja wątroby jest uznawana za złoty standard diagnostyki włóknienia wątroby [6]. Mimo swoich zalet jest procedurą inwazyjną, która może doprowadzić do komplikacji takich jak: krwawienie, ból, żółciowe zapalenie otrzewnej, nakłucie nerki lub zgon. Wykazuje się też na trudność uzyskania reprezentatywnej próbki. Ze względu na inwazyjność metody, do monitorowania i rozpoznawania włóknienia przydatne okazują się być tzw. nieinwazyjne wskaźniki funkcji wątroby, które są testami laboratoryjnymi oceniającymi funkcję wątroby. Mogą być stosowane jako pojedyncze testy lub w zestawach jako tzw. algorytmy. Ich zaletą jest możliwość wielokrotnego stosowania bez szkody dla pacjenta [7]. Należą do nich powszechnie stosowane algorytmy takie jak HEPAScore czy FibroTest oraz nieopatentowane jeszcze wzory umożliwiające ocenę włóknienia wątroby na podstawie panelu kilku badań laboratoryjnych. Do ich wyliczenia stosuje się aktywność enzymów wątrobowych (AST, ALT i GGT) oraz stężenia cholesterolu, bilirubiny i albuminy, a także liczbę płytek, wiek pacjenta i wartość BMI. Aktualnie laboratoryjne testy oceny uszkodzeń wątroby pełnią funkcję pomocniczą na etapie rozpoznania choroby, stanowiąc jednocześnie bardzo skuteczne narzędzie służące do oceny progresji/regresji zmian chorobowych oraz oceny progностycznej.

Przeprowadzony przegląd literaturowy na temat czynności wątroby w zakażeniu wirusem SARS-CoV-2 również wskazuje na ogromną rolę nieinwazyjnej diagnostyki laboratoryjnej wykorzystującej do badania krwi pobraną od pacjenta [8-10]. SARS-CoV-2 jest jednonicowym, otoczkowym wirusem RNA, wywołującym ostrą chorobę zakaźną układu oddechowego (COVID-19) [11]. Choroba miała swój początek w 2019 roku w Wuhan i od tego czasu rozprzestrzeniła się na całym świecie jako pandemia. Amerykańskie Centrum Kontroli Chorób (CDC) informuje, że koronawirus przenosi się w drobnych aerozoluach, drogą powietrzną, a przede wszystkim drogą kropelkową.

Wirus ma działanie plejotropowe, a głównym objawem zakażenia jest choroba płuc, rzadziej nerek, serca, układu nerwowego i wątroby [12]. Łagodny przebieg charakteryzuje się kaszlem, gorączką, bólem głowy, biegunką, wymiotami, utratą węchu czy smaku. W ciężkim przebiegu występuje niewydolność oddechowa, kwasica metaboliczna, a nawet wstrząs septyczny, prowadzący do zgonu [13]. Patomechanizm uszkodzenia wątroby w wyniku zakażenia SARS-CoV-2 jest złożony, spowodowany wieloma czynnikami i nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Badania naukowe wskazują na odpowiedź immunologiczną (burza cytokinowa), niedotlenienie, hipowolemię, ostrą niewydolność oddechową, jak również działanie hepatotoksyczne leków [14,15]. Aktualne badania wykazują związek między chorobą zakaźną układu oddechowego (COVID-19) a zmianą wartości wskaźników uszkodzenia hepatocytów takich jak: aminotrasferaza asparaginianowa (AST), aminotransferaza alaninowa (ALT), γ -glutamylotransferaza (GGT), bilirubina i albumina, oraz liczba płytek (PLT) [16,17].

4. CEL PRACY

1. Celem naukowym pracy doktorskiej jest wykazanie przydatności nieinwazyjnych laboratoryjnych wskaźników (tzw. biomarkerów) włóknienia wątroby w ocenie skuteczności bezinterferonowego leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna.
2. Porównanie mocy diagnostycznej nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby do mocy diagnostycznej złotego standardu, jakim jest inwazyjna biopsja wątroby.
3. Porównanie skuteczności terapii bezinterferonowej według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna, w grupie leczonej wstępnie interferonem i rybawiryną do grupy uprzednio nieleczonej.
4. Wykazanie przydatności testów oceniających funkcje wątroby (LFT) poprzez przegląd wyników opublikowanych badań przedstawiających uszkodzenie wątroby u chorych na COVID-19.

5. REALIZACJA CELÓW NAUKOWYCH

Badania eksperymentalne przeprowadzone w trakcie wykonywania pracy doktorskiej były zgodne z Deklaracją Helsińską i zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

5.1. Materiał do badań

Materiał do badań uzyskano dzięki współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych i Hepatologii, Centralnego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Warszawie. Badaniem zostało objętych 70 pacjentów z WZW typu C (32 kobiety i 38 mężczyzn). Średnia wieku kobiet to 54 lata (od 27 do 74 lat), a mężczyzn 48 lat (od 24 do 81 lat). Mediana wskaźnika masy ciała (Body Mass Index -BMI) u badanych była w normie (zakres od 12,9 do 43,1). Pacjenci byli leczeni według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna. Wykonano u nich biopsję wątroby i oceniono stopień zwłóknienia wątroby przy pomocy skali METAVIR. 39 pacjentów nie było wcześniej poddanych leczeniu (grupa nieleczona), zaś 31 pacjentów było wcześniej nieskutecznie leczonych pegylovanym interferonem- α i rybawiryną (PEG INF + RBV) (grupa leczona). Materiałem do badań była krew żylna pobrana na skrzep (bez antykoagulantu), oraz do próbki z cytrynianem sodu i EDTA. Próbkę krwi zostały pobrane od pacjentów z żyły obwodowej. Surowice po odwirowaniu rozdzielono na dwie części i do momentu oznaczenia przechowywano w temperaturze -86°C . Materiałem do badań były również próbki uzyskane z biopsji. Każdy pacjent został poddany ocenie dwukrotnie: przed rozpoczęciem leczenia oraz po 12 tygodniach terapii. Pacjenci zadeklarowali, że nie nadużywali alkoholu, czyli że nie spożywali więcej niż 2 standardowych drinków dziennie (1 drink=10 g czystego alkoholu).

5.2. Wyniki

5.2.1. Ocena stopnia zwłóknienia wątroby

Klasyfikacja stopnia zwłóknienia wątroby została przeprowadzona poprzez ocenę histopatologiczną bioptatów według skali METAVIR. Jest to pięciostopniowa skala, w której wyróżnia się stopnie nasilenia zwłóknienia (ang. i łac. fibrosis, skrót F), gdzie stopień F=0 przedstawia brak zwłóknienia, F=1 i 2 umiarkowane zwłóknienie, a 3 i 4 zaawansowane zwłóknienie i marskość [18]. Materiał do badań został pobrany zestawem do przezskórnej biopsji wątroby Hepafix 1,6 mm (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Niemcy). Biopsję wątroby oceniał histopatolog, do której dołączał protokół z pełną informacją kliniczną o pacjencie.

Skala METAVIR posłużyła również do oceny wyników elastografii. Elastografia jest metodą nieinwazyjną określającą sprężystość (sztywność) tkanek [19]. Pierwszy raz zastosowano elastografię na początku lat 90 ub. w i od tamtego czasu zaczęto wprowadzać nowe techniki oceny sztywności tkanki wątrobowej [20]. W tej pracy zastosowany został system FibroScan, który umożliwił ocenę zwłóknienia nie tylko jako wskaźników całkowitych, ale również przejściowych (F0–F1, F1–F2, F2–F3 i F3–F4). Pacjenci mieli wykonaną elastografię z wykorzystaniem FibroScan (FibroScan 502 Touch; EchoSens, Paryż, Francja). Badanie polega na wygenerowaniu fali poprzecznej, która jest mierzona za pomocą metod ultrasonograficznych, a wartość jest wyrażona w kilopaskalach (kPa). Pacjenci zostali poinformowani o konieczności niespożywania płynów na około 3 godziny przed badaniem. Pomiar trwał około 10-15 minut.

5.2.2. Określenie nieinwazyjnych wskaźników zwłóknienia wątroby

W pobranej od pacjentów krwi zostały wykonane testy biochemiczne oraz oceniono liczbę płytek krwi (PLT). Aktywności AST, ALT, GGT oraz stężenia bilirubiny, cholesterolu i albuminy oznaczono na analizatorze Cobas c501 (Hitachi, Japonia), a liczbę płytek krwi na aparacie Sysmex XS-800i (Sysmex Corporation, Singapur). Wyniki testów biochemicznych oraz PLT posłużyły do wyliczenia wartości nieinwazyjnych biomarkerów włóknienia wątroby według wzorów podanych w Tabeli 1.

Stwierdzono, że pośrednie wskaźniki włóknienia wątroby tj. APRI, GAPRI, HUI, wskaźnik FORNSA oraz AP mogą mieć znaczenie przy ocenie SVR. Wartości tych wskaźników zostały obliczone na początku leczenia oraz po 12 tygodniach terapii.

W celu potwierdzenia eradykacji wirusa HCV, na zakończenie badań wykonano pomiar wiremii. Badanie w kierunku HCV RNA zostało przeprowadzone na w pełni zautomatyzowanym analizatorze Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV, wersja 2.0 (CAP/CTM HCV; Roche Molecular Systems, Pleasanton, Kalifornia). Wykorzystana została reakcja RT-PCR, czyli łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkryptazą. Badanie zostało wykonane przed wdrożeniem terapii oraz po 12 tygodniach leczenia. Wszyscy pacjenci byli diagnozowani jako nosiciele zakażenia genotypem 1b HCV.

Tabela 1. Nieinwazyjne biomarkery włóknienia wątroby [21,22].

Biomarker	Wzór	Uwagi
GAPRI	$(GGT \text{ [IU/L]}/GGN/(\text{PLT } [10^9 \text{ /L}]) \times 100$	GGN, górna granica normy dla GGT (40 IU/L dla kobiet, 75 IU/L dla mężczyzn)
APRI	$(AST \text{ [IU/L]}/GGN/(\text{PLT } [10^9 \text{ /L}]) \times 100$	GGN, górna granica normy dla AST (50 IU/L)
FIB-4	$(\text{wiek [w latach]} \times AST \text{ [IU/L]})/(\text{PLT } [10^9 \text{ /L}] \times \sqrt{ALT \text{ [IU/L]}})$	
HUI	$3,138 + 0,167 \times \text{BMI} + 0,088 \times \text{bilirubina [mg/dl]} - 0,151 \times \text{albumina [g/dl]} - 0,019 \times \text{PLT } [10^9 \text{ /L}]$	
AP	wiek [w latach] + PLT (wiek: <30 = 0; 30–39 = 1; 40–49 = 2; 50–59 = 3; 60–69 = 4; $\geq 70 = 5$, PLT [$\times 10^9 \text{ /L}$]: $\geq 225 = 0$; 200–224 = 1; 175–199 = 2; 150–174 = 3; 125–149 = 4; <125 = 5)	
Wskaźnik Fornsa	$7,811 - 3,131 \ln(\text{PLT } [10^9 \text{ /L}]) + 0,781 \ln(\text{GGT [IU/L]}) + 3,467 \ln(\text{wiek w latach}) - 0,014(\text{cholesterol [mg/dl]})$	

5.2.3. Ocena uszkodzenia wątroby w przebiegu COVID-19

W pracy przeglądowej dotyczącej oceny uszkodzenia wątroby w przebiegu COVID-19 analizie poddano tzw. testy funkcji wątroby (LFT). Są to głównie aktywność enzymów (AST, ALT, GGT, ALP, LDH), stężenie bilirubiny, albuminy i liczba płytek krwi.

5.2.4. Metody statystyczne

Do przeprowadzenia analiz statystycznych posłużyłam się następującymi testami z programu Statistica wersja 13.3 (StatSoft, Polska):

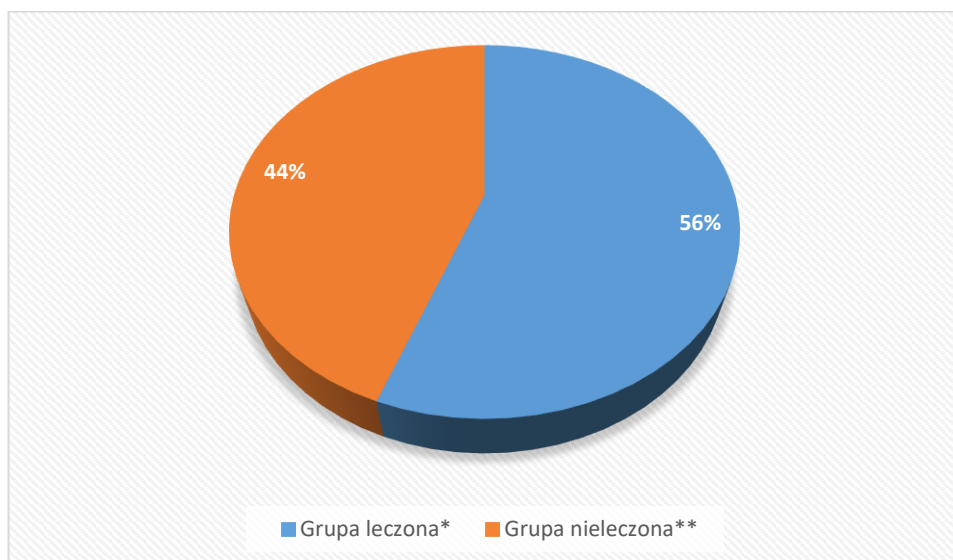
1. test Kołmogorowa–Smirnowa z poprawką Lillieforsa, do stwierdzania zgodności rozkładu z rozkładem normalnym;
2. test znaków Wilcoxona do różnicy wartości testów na początku eksperymentu oraz po 12 tygodniach;
3. test U Manna–Whitneya do oceny różnicy między grupą poddaną wcześniejszemu leczeniu pegylowanym interferonem i rybawiryną (grupa leczona) oraz grupą nieleczoną;
4. test na współczynnik korelacji rang Spearmana służący do oceny korelacji między wynikami elastografii a nieinwazyjnymi pośrednimi markerami włóknienia wątroby.

Za istotne statystycznie przyjęto wyniki posiadające wartości $p < 0,05$.

5.3. Omówienie wyników

5.3.1. Ocena stopnia zwłóknienia wątroby przy pomocy nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby

Pacjenci zostali podzieleni na grupę nieleczoną (nie poddaną wcześniej leczeniu; n=39) oraz grupę leczoną (poddaną wcześniej terapii PEG INF + RBV; n=31) [23].

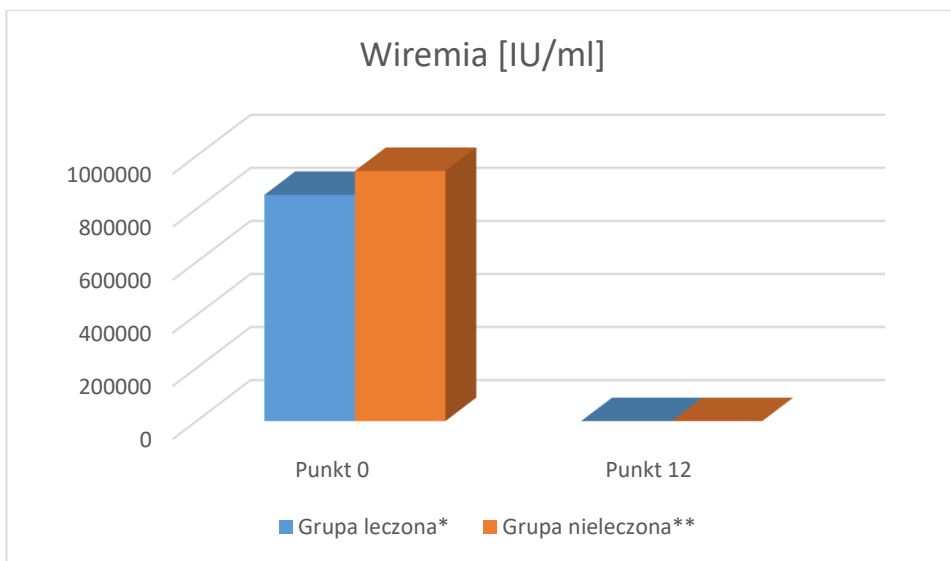


*grupa pacjentów poddanych wstępnej terapii PEG INF + RBV

** grupa pacjentów niepoddanych wstępnej terapii PEG INF + RBV

Rycina 1. Podział grupy badanej.

Na początku leczenia (punkt czasowy „0”) nie było istotnej statystycznie różnicy w poziomie wirerii między pacjentami wstępnie leczonymi PEG INF+RBV i nieleczonymi ($p=0,917$). Po 12 tygodniach leczenia poziom wirerii w obu grupach był nieoznaczalny (Rycina 2).



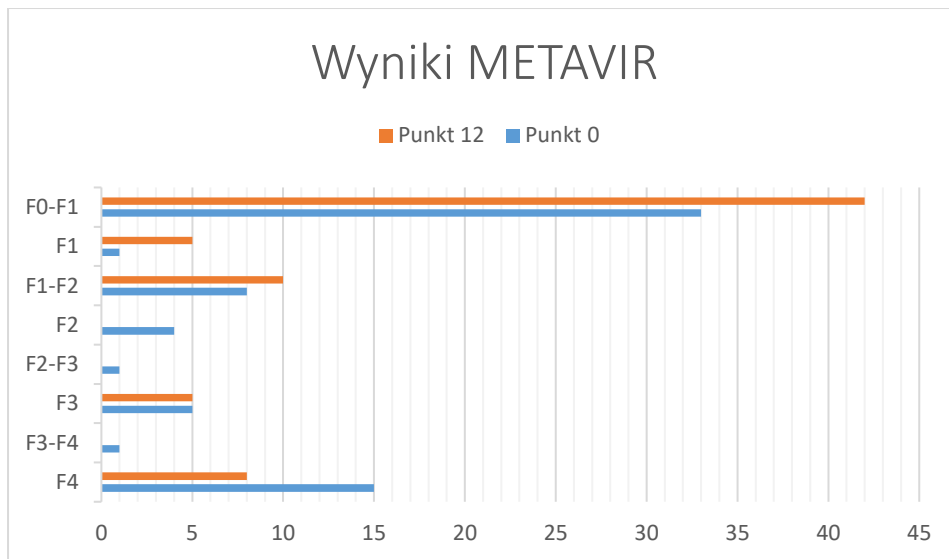
*grupa pacjentów poddanych wstępnej terapii PEG INF + RBV

** grupa pacjentów niepoddanych wstępnej terapii PEG INF + RBV

Rycina 2. Poziom wiremii (mediana) na początku leczenia oraz po 12 tygodniach terapii.

Nie odnotowano istotnej różnicy w sztywności wątroby na starcie eksperymentu (w punkcie czasowym „0”) ($p=0,376$) i po 12 tygodniach leczenia (w punkcie czasowym „12”) ($p=0,390$) pomiędzy grupą wstępnie leczoną i nieleczoną. Odnotowano zaś istotną statystycznie różnicę w sztywności wątroby u pacjentów wstępnie leczonych, na początku i końcu leczenia ($p=0,043$), podczas gdy nie odnotowano różnicy w tych dwóch punktach czasowych w grupie nieleczonej ($p=0,081$).

12 tygodniowe leczenie schematem Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna doprowadziło do zmiany częstości wyników w skali METAVIR (Rycina 3). Zwiększyła się częstość wyników przedstawiających brak włóknienia bądź umiarkowane włóknienie i równolegle zmniejszyła się częstość wyników wskazujących na zaawansowane włóknienie oraz marskość.



Rycina 3. Stadia zwłóknienia w skali METAVIR u pacjentów przed i po leczeniu schematem Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna.

Wartości parametrów biochemicznych po 12 tygodniach leczenia pacjentów zakażonych HCV różniły się istotnie statystycznie w przypadku ALT ($p=0,000$), AST ($p=0,000$), GGT ($p=0,000$) dla obu grup, leczonych i nieleczonych wstępnie, pomiędzy pomiarami w czasie „0” i „12” (Tabela 2). Liczba płytek krwi mierzona w czasie wzrosła jedynie u pacjentów wcześniej nieleczonych ($p=0,002$), podczas gdy stężenie albuminy tylko w grupie leczonej ($p=0,038$). Stężenie cholesterolu i bilirubiny całkowitej nie uległy zmianie w obu grupach pomiędzy dwoma punktami czasowymi ($p>0,05$).

Tabela 2. Zmiany parametrów biochemicznych u pacjentów z HCV przed i po 12 tygodniowym leczeniu według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna.

	Typ grupy	Tydzień kuracji	Mediana	Minimum	Maximum	p	
ALT [IU/L]	Leczona ^a n = 31	0	60	14	94	0.000 *	
		12	19	5	39		
	Nieleczona ^b n = 39	0	56	17	290	0.000 *	
		12	20	10	44		
	AST [IU/L]	Leczona ^a n = 31	0	47	26	96	0.000 *
			12	21	14	58	
Nieleczona ^b n = 39		0	45	19	309	0.000 *	
		12	21	11	41		
GGT [IU/L]		Leczona ^a n = 31	0	64	14	365	0.000 *
			12	25	10	70	
	Nieleczona ^b n = 39	0	47	11	215	0.000 *	
		12	19	9	32		
	BIL [μmol/L]	Leczona ^a n = 31	0	10.3	4.3	35.9	0.304
			12	10.3	4.4	17.1	
Nieleczona ^b n = 39		0	8.6	3.8	31.5	0.667	
		12	7.7	4.4	41.7		
PLT [×10 ⁹]		Leczona ^a n = 31	0	189	64	450	0.299
			12	187	44	427	
	Nieleczona ^b n = 39	0	216	37	431	0.002 *	
		12	229	64	409		
	ALB [g/L]	Leczona ^a n = 31	0	39	26.7	5	0.038 *
			12	43.0	36.0	47.8	
Nieleczona ^b n = 39		0	39	31.6	48.4	0.346	
		12	39	31.6	50		
CHOL [mmol/L]		Leczona ^a n = 31	0	4.78	2.63	7.75	0.983
			12	4.65	3.04	6.14	
	Nieleczona ^b n = 39	0	4.58	2.52	7.75	0.809	
		12	4.58	2.73	7.02		

*istotnie statystycznie różnica w teście U Manna–Whitneya

^a grupa pacjentów poddanych wstępnej terapii PEG INF + RBV

^b grupa pacjentów niepoddanych wstępnej terapii PEG INF + RBV

Po 12 tygodniach terapii bezinterferonowej doszło do istotnych zmian wartości wskaźników takich jak: APRI, GAPRI i w mniejszym stopniu FIB-4, wskaźnika Fornsa, AP oraz HUI. W grupie pacjentów nieleczonych uprzednio interferonem znacząco zmniejszyła się wartość APRI (około 4,2- krotnie) i GAPRI (3,7- krotnie). Natomiast w grupie wcześniej poddanej terapii PEG INF + RBV odnotowano 2,2-krotny spadek APRI oraz 2,8 krotny GAPRI. Wartość wskaźnika FIB-4 w grupie leczonej wcześniej PEG INF + RBV zmniejszyła się o 33%, wskaźnik Fornsa o 14%, podczas gdy w grupie nie poddanej wcześniej leczeniu interferonem, FIB-4 zmniejszył się o 96%, a wskaźnik Fornsa o 14%. Wskaźnik AP uległ zmianie jedynie w grupie pacjentów nie poddanych wcześniej terapii interferonem o 11%, podczas gdy wskaźnik HUI u pacjentów wcześniej leczonych PEG INF + RBV o około 6 %. Wartość wszystkich nieinwazyjnych biomarkerów włóknienia wątroby korelowała z wynikami uzyskanymi metodą FibroScan w punkcie czasowym „0”. Pod koniec terapii (po 12 tygodniach) korelacja biomarkerów włóknienia z wynikami elastografii była słabsza ($R < 0,4$), z wyjątkiem silnej korelacji z udziałem GAPRI.

Porównując moc diagnostyczną nieinwazyjnych biomarkerów włóknienia wątroby z mocą diagnostyczną wyników uzyskanych za pomocą FibroScan i w biopsji wątroby, uzyskałam niższą moc diagnostyczną (mierzoną wielkością pola pod krzywą ROC - AUC) dla różnicowania istotnego i nieistotnego włóknienia ($F < 2$ vs. $F \geq 2$) oraz różnicowania włóknienia i marskości ($F0-3$ vs. $F4$) w punkcie czasowym „0” dla APRI i GAPRI niż dla FibroScan i biopsji wątroby. Po 12 tygodniach terapii AUC dla tych testów nie różniło się znacząco dla różnicowania $F < 2$ z $F \geq 2$, podczas gdy w różnicowaniu włóknienia i marskości moc diagnostyczna APRI i GAPRI były znacząco niższe niż FibroScanu i biopsji wątroby ($p < 0,001$).

5.3.2. Wpływ zakażenia wirusem SARS-CoV-2 na wyniki badań laboratoryjnych

Przegląd dokumentacji medycznej pacjentów z ciężkim przebiegiem zakażenia wirusem SARS-CoV-2, dostarczał dowodów nieprawidłowości w wynikach badań laboratoryjnych. Pierwsze przypadki zakażenia wirusem SARS-CoV-2 zostały odnotowane w Chinach [24]. Wśród przebadanych, 48% miało podwyższone aktywności ALT, AST oraz LDH. Zauważono również zmniejszenie liczby PLT, stężenia hemoglobiny, wzrost wartości CRP, stężenia ferrytyny i aktywności kinazy kreatynowej. Na uwagę zasługuje fakt, iż większość z tych pacjentów to mężczyźni, a połowa z nich miała współistniejącą przewlekłą chorobę wątroby.

W badaniach przeprowadzonych na dużej grupie pacjentów (n=417) w szpitalu w Shenzhen (Chiny), nieprawidłowe wyniki testów uzyskano u 76% badanych, podczas gdy uszkodzenie wątroby zostało potwierdzone tylko u 21% pacjentów [25]. Największe wzrosty wartości testów wątrobowych odnotowano w 2 tygodniu hospitalizacji. Istotnym osiągnięciem tych badań było wykazanie różnic w wartościach testów laboratoryjnych w zależności od typu uszkodzenia wątroby (wątrobowokomórkowym, cholangiocytarnym i mieszanym). I tak w typie wątrobowokomórkowym występuje ponad 3-krotny wzrost wartości ALT i/lub AST, w typie cholangiocytarnym 2-krotnie zwiększona była wartość ALP lub GGT, zaś w typie mieszanym ponad 3-krotny wzrost wartości ALT i/lub AST oraz ponad 2-krotny wzrost wartości ALP lub GGT. Najczęściej, bo u 76% badanych, występował typ mieszany. Pacjenci z nieprawidłowymi LFT w momencie przyjęcia o typie wątrobowokomórkowym i mieszanym wykazywali wyższe prawdopodobieństwo rozwoju ciężkiej postaci choroby. Zauważono także, że pacjenci leczeni lopinawirem/rytonawirem mieli znacząco wysokie stężenia bilirubiny i aktywności GGT [25].

W badaniach Wang i wsp. wykazano podwyższone aktywności ALT i AST tylko u 41% pacjentów z infekcją SARS-CoV-2, jednakże korelowały one z ciężkością choroby, zwiększonym ciśnieniem parcjalnym tlenu w powietrzu pęcherzykowym, zwiększoną aktywnością GGT, zmniejszoną liczbą limfocytów T CD4+, limfocytów B i zmniejszonym stężeniem albuminy [26]. Badanie histopatologiczne u tych pacjentów potwierdziło ciężką apoptozę komórek wątrobowych.

W wielu badaniach wykazywano wpływ leczenia przeciwwirusowego w przebiegu innych chorób o etiologii wirusowej na ciężkość uszkodzenia wątroby u pacjentów z COVID-19. Wskazuje to na konieczność monitorowania u tych pacjentów parametrów wątrobowych. Opracowanie wyników 9-ciu różnych badań obejmujących 2115 pacjentów z COVID-19 metodą meta-analizy wskazało na dużą rozpiętość w uzyskaniu podwyższonych wyników AST, ALT, GGT i bilirubiny oraz zmniejszone stężenie albuminy u nie przeżywających pacjentów i wyższe ryzyko uszkodzenia wątroby u starszych pacjentów [27]. Dodatkowo w grupie pacjentów z uszkodzoną wątrobą, liczba limfocytów była znacznie zmniejszona a wartość OB znacznie zwiększona, w porównaniu z grupą bez uszkodzenia wątroby. Wskazano również na znacznie wyższą ilość uszkodzeń wątroby wśród osób leczonych lopinawirem/rytonawirem w porównaniu do nieleczonych [27]. Jednocześnie pacjenci z infekcją SARS-Cov-2 i uszkodzoną wątrobą wykazywali większe ryzyko ciężkiego przebiegu choroby i śmiertelności. Zostało to potwierdzone także w badaniach Fan i wsp., którzy odnotowali podwyższenie wartości LFT (AST, ALT, GGT, ALP i TBIL) u 58,5% pacjentów z uszkodzoną wątrobą i leczonych lopinawirem/rytonawirem w porównaniu do 31,3% z prawidłową funkcją wątroby [28]. Również badania przeprowadzone we Włoszech wykazały negatywny wpływ leczenia na wartość LFT wskazując na podwyższoną aktywność AST i ALT u pacjentów leczonych remdesiwirem [29].

Inni badacze (Hund i wsp.) zaobserwowali znaczący wzrost wartości LFT (AST o 83,4%, ALT o 61,6%, ALP o 22,7% i TBIL o 16,1 %), co także było związane z rodzajem zastosowanej terapii [lopinawirem/rytonawirem, remdesiwirem, hydroksychlorochiną, tocilizumabem oraz wiekiem i płcią pacjentów (mężczyźni) a także współwystępowaniem innych chorób [30]. Wzrost stężenia bilirubiny, aktywności AST, ALT i ALP wykazały badania w populacji indyjskiej zakażonej wirusem SARS-CoV-2, przy czym najwyższy związek z ciężkością choroby wykazywała aktywność AST i ALP [31]. Podczas badania przeprowadzonego w Stambule uchwycono podwyższone wartości nie tylko AST i ALT, ale również GGT i ALP, wskazując na wartość wskaźnika AST/ALT powyżej 1 jako dobrego wskaźnika zwiększonego ryzyka śmiertelności wśród pacjentów z infekcją SARS-CoV-2 [32]. Wskaźnik ten wskazuje na najslabszą prognozę u pacjentów z typem mieszanym uszkodzenia wątroby (36,1%) w porównaniu z uszkodzeniem wątroby typu cholestatycznego (26,5%) czy wątrobowokomórkowego (30%). Badania wykonane u ciężarnych kobiet wykazały nie tylko wzrost wartości CRP, czy aktywności AST i ALT, ale również limfopenię [33]. Jednocześnie w tych badaniach nie potwierdzono wewnątrzmacicznej infekcji płodu przez poziomą transmisję wirusa w późnej ciąży. W badaniu przeprowadzonym w 10 chińskich szpitalach w prowincji Hubei potwierdzono związek wartości LFT z ciężkością choroby wątroby, przy czym największy związek ze śmiertelnością pacjentów chorych na COVID-19 posiadała aktywność AST [34]. Ponadto, zwiększone ryzyko uszkodzenia wątroby było związane ze zmniejszoną liczbą limfocytów, zwiększoną liczbą neutrofilów oraz płcią męską. Limfocytopenia obserwowana była nawet u 83,2% pacjentów populacji Wuhan chorujących na COVID-19 [35]. Pacjenci, którzy przeszli terapię lopinawirem/rytonawirem mieli podwyższone wartości AST i GGT [36]. U 51,2% ze zdiagnozowanym COVID-19 odnotowano uszkodzenie wątroby, zaś zwiększone ryzyko śmierci związane było z typem

cholestatycznym i mieszanym uszkodzenia wątroby [36]. W badaniach metodą meta-analizy przeprowadzonego w populacji francuskiej, u 36,3% pacjentów odnotowano nieprawidłowe wyniki LFT, a ryzyko śmiertelności u tych pacjentów było silnie związane ze zwiększoną aktywnością AST lub ALT, które powinny być uznane jako wczesny markery wykrycia ciężkiej postaci choroby. [37].

5.3.3. Podsumowanie wyników badań

1. Poziom wirerii (HCV RNA), po 12 tygodniach stosowania terapii według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna w grupie nieleczonej i leczonej uprzednio PEG INF + RBV, zmniejszył się do poziomu niewykrywalnego.
2. Zastosowane leczenie spowodowało wzrost odsetka wyników przedstawiających brak włóknienia bądź umiarkowane włóknienie i zmniejszenie odsetka wyników wskazujących na zaawansowane włóknienie oraz marskość.
3. Nieinwazyjne biomarkery włóknienia wątroby (APRI, GAPRI i FIB-4) silnie korelowały z wynikami elastografii na początku leczenia, podczas gdy po 12 tygodniach leczenia, przetrwała jedynie korelacja ze wskaźnikiem GAPRI.
4. Wartość biomarkerów włóknienia wątroby jest silnie związana z jego częściami składowymi (głównie ze zmianami aktywności enzymów wątrobowych).
5. Uzyskano niższe wartości biomarkerów po 12 tygodniach stosowania terapii Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna w grupie wcześniej nieleczonej w porównaniu do grupy wstępnie leczonej PEG INF + RBV.

6. Wyniki badań laboratoryjnych w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2 potwierdzają uszkodzenie hepatocytów.
7. Zmiany wyników badań laboratoryjnych w przebiegu infekcji SARS-CoV-2 potwierdzają zależność tych wyników z ciężkością choroby oraz śmiertelnością.
8. Uszkodzenie wątroby w przebiegu zakażenia wirusem SARS-Cov-2 jest związane z wysokim stężeniem cytokin prozapalnych (tzw. burzą cytokinową) oraz zaburzoną odpowiedzią immunologiczną.
9. Liczba pacjentów chorujących na COVID-19 z nieprawidłowymi wartościami LFT była związana z rodzajem zastosowanej terapii, płcią, wiekiem oraz z występowaniem chorób współistniejących.

5.4. Dyskusja

Diagnostyka chorób wątroby ciągle stanowi wielkie wyzwanie, mimo ogromnego rozwoju medycyny, w szczególności stosowania coraz doskonalszych metod badania struktury i funkcji tego narządu. Za złoty standard uznawana jest przeszczątkowa biopsja wątroby, jednak ze względu na inwazyjność oraz obciążenie metody błędem pobrania, skłania hepatologów do ciągłego poszukiwania alternatywnych metod diagnostycznych [38,39]. Wydaje się, że szansą na rozszerzenie diagnostyki chorób wątroby oraz alternatywą dla inwazyjnej biopsji, stanowią tzw. nieinwazyjne biomarkery uszkodzenia wątroby (głównie włóknienia), oraz metody obrazowania (np. elastografii). Przemawia ze tym wysoka korelacja z wynikami biopsji, przydatnych w szczególności do wykluczenia marskości bądź istotnego włóknienia [40-42]. W naszym badaniu, do oceny skuteczności terapii bezinterferonowej stosowanej u pacjentów zakażonych wirusem HCV, oprócz biopsji, zostały zastosowane nieinwazyjne pośrednie wskaźniki włóknienia wątroby: APRI, GAPRI, HAPRI FIB-4, AP, indeks Fornsa, wskaźnik HUI oraz metoda elastografii.

Badanie HCV RNA przeprowadzone na obu grupach pacjentów (leczonych wstępnie i nieleczonych interferonem), po 12 tygodniach stosowania terapii według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna, potwierdziło jej skuteczność. Test RT-PCR zastosowany do pomiaru wirerii, udowodnił osiągnięcie trwałej odpowiedzi wirusologicznej po 12 tygodniach leczenia (SVR12) u osób z genotypem 1b HCV. Jest to najlepszy sposób na udowodnienie sukcesu terapeutycznego [43-46]. Niewykrywalny poziom wirerii potwierdza jego 100% eradykację, ale nie oznacza całkowitego wyleczenia pacjenta, co potwierdzają wyniki biopsji, elastografii oraz wyniki nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby. Uzyskano wprawdzie duży spadek odsetka wyników potwierdzających marskość wątroby (F4); odsetek ten zmniejszył się z 21,4% do 11,4 %, oraz z zaawansowanym włóknieniem ($F \geq 2$) z 30% do 18,5%, po 12 tygodniach stosowania terapii bezinterferonowej. Wskazuje to na zbyt krótki czas na całkowitą regresję włóknienia oraz konieczność kontynuacji leczenia w celu zahamowania i/lub odwrócenia włóknienia. Do oceny stopnia włóknienia posłużył system punktacji METAVIR [47-49]. Obie metody, biopsja i elastografia, pozwalają na rozróżnienie włóknienia, jednak przy pomocy elastografii nie jest możliwa ocena narządów jamy brzusznej pod kątem morfologicznym [50-52]. Pomiar sztywności wątroby (LSM) przy użyciu elastografii umożliwia ocenę zmian w całym narządzie, podczas gdy biopsja igłowa ograniczona jest do oceny niewielkiej objętości próbki wątroby [53,54]. Równoległe do biopsji i elastografii, wykonano oznaczenia służące do oceny nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby.

Badania wykazały, że dwa spośród oznaczanych wskaźników, APRI i GAPRI, uzyskały wartości niższe od wartości odcięcia (cut-off) dla zaawansowanego włóknienia, czego nie potwierdzają wyniki elastografii i biopsji. Wskazuje to na nieprzydatność tych wskaźników jako predyktorów istotnego

włóknienia. Pośrednim dowodem jest trend spadkowy w teście chi-kwadrat dla trendów uzyskany w obu grupach w trakcie leczenia. Wprawdzie oba te testy wydają się być przydatne w różnicowaniu istotnego od nieistotnego włóknienia, ponieważ pola pod krzywą (AUC) dla tych wskaźników uzyskały wartości powyżej 0,8, jednakże były niższe od mocy diagnostycznej biopsji i elastografii.

Nieinwazyjne biomarkery włóknienia wątroby w swoich wzorach zawierają enzymy, które wskazują nie tylko na uszkodzenie hepatocytów, ale również na zapalenie wątroby. W przypadku GAPRI jest to GGT, w przypadku APRI – AST, a dla FIB-4 jest to AST i ALT [55,56]. Tak więc, na początku eksperymentu, kiedy stan zapalny był najsilniej wyrażony, wszystkie te biomarkery silnie korelowały z wynikami elastografii, zaś po 12 tygodniach odnotowano znaczne zmniejszenie wartości tych wskaźników i znaczne zmniejszenie korelacji wskaźników z wynikami elastografii. Wskazuje to na wygaszenie stanu zapalnego jako głównej przyczyny zmiany wartości biomarkerów po 12 tygodniach leczenia.

Ważnym osiągnięciem tych badań było uzyskanie wartości nieinwazyjnych biomarkerów włóknienia wątroby poniżej wartości granicznej dla istotnego włóknienia po ukończonej terapii, głównie w grupie pacjentów wcześniej nieleczonych PEG INF + RBV [57-59]. W obu grupach wartości APRI i GAPRI były poniżej wartości odcięcia dla istotnego włóknienia, podczas gdy wartości FIB-4, AP i indeks Fornsa uzyskały ten poziom tylko w grupie wcześniej nieleczonych [57,59,60]. Fakt, że średnie wartości pomiaru sztywności wątroby nie przekroczyły granicy dla nieistotnego zwłóknienia wątroby, oznacza lepszą korelację elastografii z biopsją wątroby niż z wartością nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby [61].

Istotną obserwacją tych badań jest wykazanie spadku wartości nieinwazyjnych biomarkerów włóknienia wątroby po 12 tygodniach terapii według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna, przy czym tylko wartość wskaźnika FIB-4, Fornsa i AP był istotnie niższy w grupie wcześniej nieleczonej niż w grupie poddanej wcześniej terapii interferonowej. W przypadku biomarkerów zawierających w swojej formule składowe inne niż aktywność enzymów wątrobowych, takie jak liczbę płytek krwi (AP), bilirubinę i albuminę (wskaźnik HUI) czy stężenie cholesterolu (indeks FORNSA), zmieniły się one nieznacznie, gdyż nieznacznie lub w ogóle nie zmieniły się ich składowe. Tak więc zmiany wartości wskaźnika FORNSA były zależne od zmian wartości GGT i PLT. Identyczną zależność możemy zaobserwować dla wskaźnika HUI, którego wartość zmieniała się wraz ze zmianą stężenia albuminy i liczby płytek krwi. W podsumowaniu można stwierdzić, iż zmiany wartości nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby są silnie zależne od zmian wartości ich części składowych.

Badania laboratoryjne są bardzo ważnym elementem w całym procesie diagnostyczno-terapeutycznym chorób zakaźnych. Pozwalają na rozpoznanie zakażenia, nawet gdy przebiega bezobjawowo, a następnie na monitorowanie stanu pacjenta. Ze względu na szerzącą się pandemię spowodowaną wirusem SARS-CoV-2, przeanalizowaliśmy dostępne w literaturze wyniki dotyczące testów funkcji wątroby (LFT) u zakażonych pacjentów [62,63]. Analiza wskazała, że u pacjentów hospitalizowanych z powodu COVID-19, często lub bardzo często występują nieprawidłowości w wartościach LFT, głównie AST, ALT, GGT, albuminy i bilirubiny [64]. Na uwagę zasługuje również fakt, iż nieprawidłowości w LFT występowały częściej u mężczyzn niż u kobiet [24,27,30,34]

Pomimo, iż COVID-19 zostało uznane za pandemię przez Światową Organizację Zdrowia w marcu 2020, już w tym samym roku pojawiły się pierwsze doniesienia mówiące o szkodliwym wpływie infekcji SARS-CoV-2 na funkcjonowanie innych narządów w tym wątroby [11-14, 64-67]. Jak dotychczas nie udało się jednoznacznie wskazać na patomechanizm uszkodzenia wątroby w COVID-19. Z jednej strony, uszkodzenie wątroby może być efektem bezpośredniego działania wirusa na komórki wątrobowe, ponieważ komórki te posiadają na swojej powierzchni odpowiednie receptory. Mowa tu receptorach ACE2, których ekspresję zaobserwowano zarówno na hepatocytach jak i komórkach nabłonkowych dróg żółciowych [65,66]. Najnowsze badania wskazują na występowanie ekspresji ACE2 w 2,6% hepatocytów i 59,7 % cholangiocytołów [11,66]. A ponieważ komórki nabłonka dróg żółciowych pełnią istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej oraz regeneracji wątroby, to właśnie na nie wskazuje się jako pierwotną przyczynę uszkodzenia wątroby w przebiegu infekcji SARS-CoV-2 [66].

Uszkodzenie wątroby w przebiegu zakażenia wirusem SARS-Cov-2 możliwe jest również ze względu na rozregulowanie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [11,64,66]. Manifestuje się to wysokimi stężeniami cytokin prozapalnych (tzw. burzę cytokinową), takich jak IL-6, IL-2, IL-7, IL-10, TNF- α , czy interferony [27,68,69]. Badania te wskazują na związek uszkodzenia wątroby a reakcją zapalną silnie indukowaną w ciężkiej postaci choroby.

Trzecim ważnym mechanizmem uszkodzenia wątroby w infekcjach spowodowanych przez SARS-CoV-2 jest toksyczny wpływ leków antywirusowych (również antybiotyków i sterydów) stosowanych w przewlekłych chorobach infekcyjnych innych niż COVID-19, np. w przebiegu WZW typu C [14,15]. Okazało się również, że niektóre leki stosowane w terapii COVID-19

(lopinawirem i/lub rytonawirem) powodowały uszkodzenie wątroby widoczne w wysokich wzrostach wartości LFT [25,28].

Udokumentowano również zależność ciężkości uszkodzenia wątroby (w tym śmiertelności) z wartościami testów funkcji wątroby [31,70,71]. Oznacza to, że wyższe wartości testów wątrobowych (AST, ALT, GGT i bilirubiny) były częściej zgłaszane podczas ciężkiej postaci COVID-19 [37,72,73]. Bezpośrednim dowodem na związek wartości LFT z ciężkością uszkodzenia jest korelacja aktywności transaminaz z większą różnicą ciśnienia parcjalnego tlenu w pęcherzykach płucnych chorych na COVID-19 [26]. Pośrednim zaś, jest powiązanie podwyższonych wartości LFT z wydłużeniem czasu hospitalizacji oraz częstszym przyjęciem na Oddział Intensywnej Terapii [32,37]. W oparciu o opublikowane dane najczęściej zgłaszanym parametrem w ciężkim przebiegu COVID-19 był AST [34-36]. Wysokie wartości enzymów wątrobowych (AST, ALT, GGT) oraz bilirubiny są także związane z wyższą śmiertelnością pacjentów z ciężką postacią choroby [34]. Przekonującego dowodu na związek wartości LFT ze śmiertelnością dostarczyły badania przeprowadzone w Istambule, w których udowodniono znacząco wyższą śmiertelność pacjentów z nieprawidłowymi wynikami AST oraz ALT w porównaniu do pacjentów z wynikami prawidłowymi [32]. Nieprawidłowości w wynikach testów wątrobowych, większe w ciężkim przebiegu choroby, mogą być zdaniem francuskich badaczy, spowodowane sepsą i hipoksemią tkankową [37]. Potwierdzono taką możliwość w badaniu histopatologicznym, w którym uwidocznione było stłuszczenie pęcherzykowe i zwyrodnienie wodniste [37]. Cięższe uszkodzenie wątroby manifestuje się nie tylko wyższymi wartościami enzymów wątrobowych, ale także ich korelacja z markerami zapalenia, wykazano na przykładzie CRP i ferrytyny [74]. Kolejni badacze potwierdzili związek LFT z wartościami testów prozapalnych tj. CRP i

prokalcytoniną i ferrytyną, oraz D-dimerami, mleczanami i bilirubiną, co w konsekwencji pogłębia uszkodzenie wątroby i przedłuża czas hospitalizacji [32].

Udowodniono także związek wartości LFT z leczeniem przeciwwirusowym. I tak pacjenci leczeni lopinawirem/rytonawirem mieli znacznie wyższy poziom bilirubiny i GGT niż nieleczeni, co skutkowało czterokrotnym wzrostem ryzyka uszkodzenia wątroby i wystąpienia ostrej postaci choroby [25]. W badaniach tych 76% pacjentów wykazało zmiany w wartości LFT, podczas gdy uszkodzenie wątroby zostało potwierdzone u niespełna 22% hospitalizowanych pacjentów. Potwierdzenie toksycznego wpływu leczenia lopinawirem/rytonawirem można odszukać w pracach innych autorów [36]. Wpływ na wartości LFT może mieć także zmiana terapii przeciwwirusowej, co wykazano w badaniach włoskich naukowców [29]. Zmiana modelu terapeutycznego z lopinawiru/rytonawiru na remdesiwir powodowało znaczne zmniejszenie stężenia bilirubiny oraz duży wzrost aktywności AST i ALT [29]. Dlatego tak istotne jest, aby zastosowana terapia nie tylko hamowała odpowiedź zapalną, ale i również nie prowadziła do zaburzeń funkcji wątroby. Tak jak w przypadku terapii umifenowirem, gdzie nie odnotowano różnicy w wartości LFT (AST, ALT, GGT i bilirubina) u leczonych oraz nieleczonych tym preparatem [36].

Publikowane badania u chorych zakażonych wirusem SARS-CoV-2 zwracają szczególną uwagę na choroby współistniejące. Pacjenci z otyłością i większą ekspresją receptorów ACE2 wykazują większe ryzyko rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) oraz ciężkiej postaci COVID-19 [75]. Dodatkowo istniejące już choroby wątroby mogą wpływać na ciężkość przebiegu COVID-19, co może być związane z niższym poziomem limfocytów i PLT [76]. Udowodniono to na przykładzie nowotworów, które mogą

zwiększać ryzyko zakażenia wirusem SARS-CoV-2 [77]. Współistniejąc choroby wątroby mogą również doprowadzić do ciężkiego uszkodzenia wątroby u pacjentów z COVID-19 [78,79]. Nasilenie uszkodzenia wątroby w przypadku koinfekcji SARS-CoV-2 HBV występowało u 28,57% pacjentów i prowadziło do ostrej niewydolności w przewlekłej chorobie wątroby [80].

6. WNIOSKI

- 1.** Niewykrywalna wiremia po 12 tygodniach stosowania terapii według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna, pomimo, iż oznacza 100% eradykację wirusa HCV, jednakże nie jest równoznaczna z całkowitą regresją włóknienia i wiąże się z koniecznością dalszego leczenia.
- 2.** Wartości nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby zależą od stopnia zaawansowania włóknienia na początku terapii oraz zależą od wcześniejszej terapii PEG INF + RBV.
- 3.** Po zastosowaniu leczenia bezinterferonowego według w/w schematu, wartość nieinwazyjnych markerów włóknienia wątroby wskazuje na brak istotnego włóknienia, co jest niezgodne z wynikami badań histopatologicznych i elastografii. Wynikać to może z faktu, iż we wzorach tych biomarkerów znajdują się z jednej strony testy potwierdzające stan zapalny narządu a z drugiej mówiące o uszkodzeniu struktury hepatocytów.
- 4.** Nie u wszystkich pacjentów z COVID-19 dochodzi do uszkodzenia wątroby i w konsekwencji do zmiany wartości testów funkcji wątroby (LFT).
- 5.** Pacjenci z chorobą COVID-19 i z nieprawidłowymi wynikami testów wątrobowych to głównie mężczyźni, osoby w starszym wieku oraz pacjenci z chorobami współistniejącymi.
- 6.** Pacjenci z istniejącymi schorzeniami wątroby są obarczeni wyższym ryzykiem ciężkiego przebiegu COVID-19 i śmiertelnością.

7. LITERATURA

1. Bertino G, Ardiri A, Proiti M, Rigano G, Frazzetto E, Demma S, Ruggeri MI, Scuderi L, Malaguarnera G, Bertino N, Rapisarda V, Di Carlo I, Toro A, Salomone F, Malaguarnera M, Bertino E, Malaguarnera M. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. *World J Hepatol.*, 2016, 8, 92-106.
2. ASLD/IDSA HCV guidance panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology*, 2015, 62, 932–954.
3. Cowie BC, Allard N, MacLachlan JH. O86 European responses in focus: comparing viral hepatitis and hiv related deaths in europe 1990-2010 in the global burden of disease study 2010. *J Hepatol.*, 2014, 60, 35–36.
4. European Association for the Study of the Liver EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J Hepatol.*, 2018, 69, 461–511.
5. Ahmed H, Abushouk AI, Menshawy A, Mohamed A, Negida A, Loutfy SA, Abdel-Daim MM. Safety and Efficacy of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir and Dasabuvir with or without Ribavirin for Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 1: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Drug Investig.*, 2017, 37, 1009-1023.
6. Cadranet JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology*, 2000, 32, 477-481.
7. Stauber RE, Lackner C. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.*, 2007, 13, 4287-4294.
8. Yang W, Cao Q, Qin L, Wang X, Cheng Z, Pan A, Dai J, Sun Q, Zhao F, Qu J, Yan F. Clinical characteristics and imaging manifestations of the

- 2019 novel coronavirus disease (COVID-19):A multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. *J Infect.*, 2020, 80, 388–393.
9. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, 323, 1061–1069.
 10. Zhang JJ, Dong X, Cao YY, Yuan YD, Yang YB, Yan YQ, Akdis CA, Gao YD. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 2020, 75, 1730–1741.
 11. Tian D, Ye Q. Hepatic complications of COVID-19 and its treatment. *J Med Virol.*, 2020, 92, 1818–1824.
 12. Gavriatopoulou M, Korompoki E, Fotiou D, Ntanasis-Stathopoulos I, Psaltopoulou T, Kastritis E, Terpos E, Dimopoulos MA. Organ-specific manifestations of COVID-19 infection. *Clin Exp Med.*, 2020, 20, 493–506.
 13. Jain U. Effect of COVID-19 on the Organs. *Cureus*, 2020, 12, e9540.
 14. Boeckmans J, Rodrigues RM, Demuyser T, Piérard D, Vanhaecke T, Rogiers V. COVID-19 and drug-induced liver injury: a problem of plenty or a petty point? *Arch Toxicol.*, 2020, 94, 1367–1369.
 15. Bonacini M. Liver injury during highly active antiretroviral therapy: the effect of hepatitis C coinfection. *Clin Infect Dis.*, 2004, 38, S104–S108.
 16. Liu Z, Guo J. Dynamic changes of liver function and myocardial enzyme in 259 patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Hepatol.*, 2003, 3, 129–131
 17. Lu Y, Yin C, Tang X, et al. Clinical characteristics and mechanism of liver function injury in 250 patients with severe acute respiratory syndrome. *Chin J Mod Med.*, 2004, 23, 121–123.

18. Hytioglou P, Thung SN, Gerber MA. Histological classification and quantitation of the severity of chronic hepatitis: keep it simple!. *Semin Liver Dis.*, 1995, 15, 414-421.
19. Manduca A, Oliphant TE, Dresner MA, et al. Magnetic resonance elastography: non-invasive mapping of tissue elasticity. *Med Image Anal.*, 2001, 5, 237-254.
20. Sarvazyan A, Hall TJ, Urban MW, Fatemi M, Aglyamov SR, Garra BS. An overview of elastography – an emerging branch of medical imaging. *Curr Med Imaging Rev.*, 2011, 7, 255-282.
21. Chrostek L, Przekop D, Gruszewska E, Gudowska-Sawczuk M, Cylwik B. Noninvasive Indirect Markers of Liver Fibrosis in Alcoholics. *Biomed Res Int.*, 2019, 2019, 3646975
22. Hui AY, Chan HL, Wong VW, et al. Identification of chronic hepatitis B patients without significant liver fibrosis by a simple noninvasive predictive model. *Am J Gastroenterol.*, 2005, 100, 616-623.
23. Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, Golaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C. *J Clin Med.*, 2021, 10, 3951.
24. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, 395, 507–513.
25. Cai Q, Huang D, Yu H, Zhu Z, Xia Z, Su Y, Li Z, Zhou G, Gou J, Qu J, Sun Y, Liu Y, He Q, Chen J, Liu L, Xu L. COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol.*, 2020, 73, 566–574.

26. Wang Y, Liu S, Liu H, Li W, Lin F, Jiang L, Li X, Xu P, Zhang L, Zhao L, Cao Y, Kang J, Yang J, Li L, Liu X, Li Y, Nie R, Mu J, Lu F, Zhao S, Lu J, Zhao J. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol.*, 2020, 73, 807–816.
27. Yadav DK, Singh A, Zhang Q, Bai X, Zhang W, Yadav RK, Zhiwei L, Adhikari VP, Liang T. Involvement of liver in COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Gut*, 2021, 70, 807–809.
28. Fan Z, Chen L, Li J, Cheng X, Yang J, Tian C, Zhang Y, Huang S, Liu Z, Cheng J. Clinical Features of COVID-19-Related Liver Functional Abnormality. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2020, 18, 1561–1566.
29. Zampino R, Mele F, Florio LL, Bertolino L, Andini R, Galdo M, De Rosa R, Corcione A, Durante-Mangoni E. Liver injury in remdesivir-treated COVID-19 patients. *Hepatol Int.*, 2020, 14, 881–883.
30. Hundt MA, Deng Y, Ciarleglio MM, Nathanson MH, Lim JK. Abnormal Liver Tests in COVID-19: A Retrospective Observational Cohort Study of 1,827 Patients in a Major U.S. Hospital Network. *Hepatology*, 2020, 72, 1169–1176.
31. Kumar A, Kumar P, Dungdung A, Kumar Gupta A, Anurag A, Kumar A. Pattern of liver function and clinical profile in COVID-19: A cross-sectional study of 91 patients. *Diabetes Metab Syndr.*, 2020, 14, 1951–1954.
32. Medetalibeyoglu A, Catma Y, Senkal N, Ormeci A, Cavus B, Kose M, Bayramlar OF, Yildiz G, Akyuz F, Kaymakoglu S, Tukek T. The effect of liver test abnormalities on the prognosis of COVID-19. *Annals of hepatology*, 2020, 19, 614–621.

33. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, Li J, Zhao D, Xu D, Gong Q, Liao J, Yang H, Hou W, Zhang Y. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*, 2020, 395, 809–815.
34. Lei F, Liu YM, Zhou F, Qin JJ, Zhang P, Zhu L, Zhang XJ, Cai J, Lin L, Ouyang S, Wang X, Yang C, Cheng X, Liu W, Li H, Xie J, Wu B, Luo H, Xiao F, Chen J, Tao L, Cheng G, She ZG, Zhou J, Wang H, Lin J, Luo P, Fu S, Ye P, Xiao B, Mao W, Liu L, Yan Y, Chen G, Huang X, Zhang BH, Yuan Y. Longitudinal Association Between Markers of Liver Injury and Mortality in COVID-19 in China. *Hepatology*, 2020, 72, 389–398.
35. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.*, 2020, 382, 1708–1720.
36. Chu H, Bai T, Chen L, Hu L, Xiao L, Yao L, Zhu R, Niu X, Li Z, Zhang L, Han C, Song S, He Q, Zhao Y, Zhu Q, Chen H, Schnabl B, Yang L, Hou X. Multicenter Analysis of Liver Injury Patterns and Mortality in COVID-19. *Front Med (Lausanne).*, 2020, 7, 584342.
37. Chaibi S, Boussier J, Hajj WE, Abitbol Y, Taieb S, Horaist C, Jouannaud V, Wang P, Piquet J, Maurer C, Lahmek P, Nahon S. Liver function test abnormalities are associated with a poorer prognosis in Covid-19 patients: Results of a French cohort. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.*, 2021, 45, 101556.

38. Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol.*, 2015, 21, 11567-11583.
39. Lai M, Afdhal NH. Liver Fibrosis Determination. *Gastroenterol Clin North Am.*, 2019, 48, 281-289.
40. Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol.*, 2014, 20, 16820-16830.
41. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med.*, 2013, 159, 372.
42. Tsochatzis EA, Gurusamy KS, Ntaoula S, Cholongitas E, Davidson BR, Burroughs AK. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Hepatol.*, 2011, 54, 650-659.
43. Pessoa MG, Ramalho-Madruga JV, Alves K, et al. Efficacy and Safety of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir and Dasabuvir \pm Ribavirin for HCV in Brazilian Adults with Advanced Fibrosis. *Ann Hepatol.*, 2018, 17, 959-968.
44. Badri PS, King JR, Polepally AR, McGovern BH, Dutta S, Menon RM. Dosing Recommendations for Concomitant Medications During 3D Anti-HCV Therapy. *Clin Pharmacokinet.*, 2016, 55, 275-295.
45. Poordad F, Nelson DR, Feld JJ, Fried MW, Wedemeyer H, Larsen L, Cohen DE, Cohen E, Mobashery N, Tatsch F, Foster GR. Safety of the 2D/3D direct-acting antiviral regimen in HCV-induced Child-Pugh A cirrhosis - A pooled analysis. *J. Hepatol.*, 2017, 67, 700-707.
46. Leung DH, Wirth S, Yao BB, Viani RM, Gonzalez-Peralta RP, Jonas MM, Lobritto SJ, Narkewicz MR, Sokal E, Fortuny C, Hsu EK, Del Valle-Segarra A, Zha J, Larsen L, Liu L, Shuster DL, Cohen DE, Rosenthal P.

- Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir With or Without Dasabuvir and With or Without Ribavirin for Adolescents With HCV Genotype 1 or 4. *Hepatol Commun.*, 2018, 2, 1311-1319.
47. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 1344–1355.
 48. Spycher C, Zimmermann A, Reichen J. The diagnostic value of liver biopsy. *BMC Gastroenterol.*, 2001, 1, 12.
 49. Saadi T, Khoury J, Toukan W, Krimasky R, Veitsman E, Baruch Y, Gaitini D, Beck-Razi N. Point Shear Wave Elastography for Assessing Liver Stiffness in Chronic Liver Diseases of Different Etiologies Compared to Biopsy. *Isr Med Assoc J.*, 2021, 23, 223-228.
 50. Gerber MA, Thung SN. Histology of the liver. *Am J Surg Pathol.*, 1987, 11, 709-22.
 51. Fang C, Lim A, Sidhu PS. Ultrasound-based liver elastography in the assessment of fibrosis. *Clin Radiol.*, 2020, 75, 822-831.
 52. Pavlov CS, Casazza G, Nikolova D, Tsochatzis E, Burroughs AK, Ivashkin VT, Gluud C. Transient elastography for diagnosis of stages of hepatic fibrosis and cirrhosis in people with alcoholic liver disease. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2015, 1, CD010542.
 53. Shaheen AA, Wan AF, Myers RP. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol.*, 2007, 102, 2589-2600.

54. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.*, 2003, 29, 1705-1713.
55. Gudowska M, Gruszewska E, Panasiuk A, Cylwik B, Flisiak R, Świdarska M, Szmitkowski M, Chrostek L. Hyaluronic acid concentration in liver diseases. *Clin Exp Med.*, 2016, 16, 523-528.
56. Vardar R, Vardar E, Demiri S, Sayhan SE, Bayol U, Yildiz C, Postaci H. Is there any non-invasive marker replace the needle liver biopsy predictive for liver fibrosis, in patients with chronic hepatitis? *Hepatogastroenterology*, 2009, 56, 1459–1465.
57. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003, 38, 518-26.
58. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*, 2007, 46, 32-36.
59. Sahin T, Serin A, Emek E, Bozkurt B, Arıkan BT, Tokat Y. Effectiveness of Noninvasive Fibrosis Markers for the Prediction of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B and Chronic Hepatitis B+D Induced Cirrhosis. *Transplant Proc.*, 2019, 51, 2397-2402.
60. Gökcan H, Kuzu UB, Öztaş E, Saygılı F, Öztuna D, Suna N, Tenlik İ, Akdoğan M, Kaçar S, Kılıç ZM, Kayaçetin E. The predictive value of noninvasive serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Turk J Gastroenterol.*, 2016, 27, 156–164.
61. Arena U, Vizzutti F, Abraldes JG, Corti G, Stasi C, Moscarella S, Milani S, Loreface E, Petrarca A, Romanelli RG, Laffi G, Bosch J, Marra F,

- Pinzani M. Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut*, 2008, 57, 1288–1293.
62. Lai CKC, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2021, 538, 226-230.
63. Bertolini A, van de Peppel IP, Bodewes FAJA, Moshage H, Fantin A, Farinati F, Fiorotto R, Jonker JW, Strazzabosco M, Verkade HJ, Peserico G. Abnormal Liver Function Tests in Patients With COVID-19: Relevance and Potential Pathogenesis. *Hepatology*, 2020, 72, 1864-1872.
64. Alqahtani SA, Schattenberg JM. Liver injury in COVID-19: The current evidence. *United European Gastroenterol J.*, 2020, 8, 509-519.
65. Ciaccio M, Agnello L. Biochemical biomarkers alterations in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Diagnosis (Berlin, Germany)*, 2020, 7, 365-372.
66. Ali N, Hossain K. Liver injury in severe COVID-19 infection: current insights and challenges. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2020, 14, 879–884.
67. Zhang Y, Zheng L, Liu L, Zhao M, Xiao J, Zhao Q. Liver impairment in COVID-19 patients: A retrospective analysis of 115 cases from a single centre in Wuhan city, China. *Liver Int.*, 2020, 40, 2095–2103.
68. Luo XH, Zhu Y, Mao J, Du RC. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. *Scand J Immunol.*, 2021, 93, e12989.
69. Taneva G, Dimitrov D, Velikova T. Liver dysfunction as a cytokine storm manifestation and prognostic factor for severe COVID-19. *World J Hepatol.*, 2021, 13, 2005-2012.
70. Choudhary NS, Dhampalwar S, Saraf N, Soin AS. Outcomes of COVID-19 in Patients with Cirrhosis or Liver Transplantation. *J Clin Exp Hepatol.*, 2021, 11, 713-719.

71. Bloom PP, Meyerowitz EA, Reinus Z, Daidone M, Gustafson J, Kim AY, Schaefer E, Chung RT. Liver Biochemistries in Hospitalized Patients With COVID-19. *Hepatology*, 2021, 73, 890–900.
72. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, 395, 497–506.
73. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW the Northwell COVID-19 Research Consortium, Barnaby DP, Becker LB, Chelico JD, Cohen SL, Cookingham J, Coppa K, Diefenbach MA, Dominello AJ, Duer-Hefele J, Falzon L, Gitlin J, Hajizadeh N, Harvin TG, Hirschwerk DA, Kim EJ, Kozel ZM, Marrast LM, Mogavero JN, Osorio GA, Qiu M, Zanos TP. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*, 2020, 323, 2052–2059.
74. Saini RK, Saini N, Ram S, Soni SL, Suri V, Malhotra P, Kaur J, Verma I, Sharma S, Zohmangaihi D. COVID-19 associated variations in liver function parameters: a retrospective study. *Postgrad Med J.*, 2022, 98, 91-97.
75. Zheng KI, Gao F, Wang XB, Sun QF, Pan KH, Wang TY, Ma HL, Chen YP, Liu WY, George J, Zheng MH. Letter to the Editor: Obesity as a risk factor for greater severity of COVID-19 in patients with metabolic associated fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*, 2020, 108, 154244.

76. Qi X, Liu Y, Wang J, Fallowfield JA, Li X, Shi J, Pan H, Zou S, Zhang H, Chen Z, Li F, Luo Y, Mei M, Liu H, Wang Z, Li J, Yang H, Xiang H, Liu T, Zheng MH, Liu C, Huang Y, Xu D, Kang N, He Q, Gu Y, Zhang G, Shao C, Liu D, Zhang L, Kawada N, Jiang Z, Wang F, Xiong B, Takehara T, Rockey DC COVID-Cirrhosis-CHESS Group. Clinical course and risk factors for mortality of COVID-19 patients with pre-existing cirrhosis: a multicentre cohort study. *Gut*, 2021, 70, 433–436.
77. Liang W, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K, Li C, Ai Q, Lu W, Liang H, Li S, He J. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *Lancet Oncol.*, 2020, 21, 335–337.
78. Singh S, Khan A. Clinical Characteristics and Outcomes of Coronavirus Disease 2019 Among Patients With Preexisting Liver Disease in the United States: A Multicenter Research Network Study. *Gastroenterology*, 2020, 159, 768–771.
79. Moon AM, Webb GJ, Aloman C, Armstrong MJ, Cargill T, Dhanasekaran R, Genescà J, Gill US, James TW, Jones PD, Marshall A, Mells G, Perumalswami PV, Qi X, Su F, Ufere NN, Barnes E, Barritt AS, Marjot T. High mortality rates for SARS-CoV-2 infection in patients with pre-existing chronic liver disease and cirrhosis: Preliminary results from an international registry. *J Hepatol.*, 2020, 73, 705–708.
80. Zou X, Fang M, Li S, Wu L, Gao B, Gao H, Ran X, Bian Y, Li R, ShanshanYu , Ling J, Li D, Tian D, Huang J. Characteristics of Liver Function in Patients With SARS-CoV-2 and Chronic HBV Coinfection. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2021, 19, 597–603.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Za złoty standard włóknienia wątroby wciąż uznawana jest przeszczątkowa biopsja wątroby. Jest to procedura inwazyjna i może prowadzić do różnych komplikacji. Poza tym, wynik badania może być obarczony błędem z powodu nie uzyskania reprezentatywnej próbki. W ostatnim okresie pojawiły się alternatywne do biopsji wątroby metody diagnostyczne umożliwiające nieinwazyjne rozpoznawanie i monitorowanie włóknienia. Należą do nich algorytmy (wzory) umożliwiające ocenę włóknienia wątroby na podstawie panelu kilku badań laboratoryjnych oraz cechy fizyczne (AST, ALT, GGT, PLT, bilirubina, albuminy, cholesterol oraz wiek pacjenta, BMI). W odróżnieniu od biopsji wątroby, testy nieinwazyjne mogą być wykonywane wielokrotnie bez szkody i bez ryzyka powikłań zdrowotnych pacjentów, dlatego są bardzo dobrym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym ocenę dynamiki procesu włóknienia wątroby u chorych na przewlekłe choroby wątroby, w szczególności w WZW typu C.

Ponadto, z uwagi na szerzącą się pandemię wirusa SARS-CoV-2 i jego plejotropowe działanie, ważnym aspektem jest ocena funkcji wątroby w przebiegu zakażenia tym wirusem. Ocena stanu funkcjonalnego wątroby jest ważnym elementem procesu diagnostycznego i terapeutycznego ze względu na wpływ zastosowanej terapii zasadniczej choroby oraz chorób towarzyszących na procesy metaboliczne zachodzące w tym narządzie.

W związku z powyższym:

1. Celem naukowym pracy doktorskiej jest wykazanie przydatności nieinwazyjnych laboratoryjnych wskaźników włóknienia wątroby w ocenie skuteczności bezinterferonowego leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C.

2. Ocena i porównanie mocy diagnostycznej nieinwazyjnych wskaźników włóknienia wątroby do mocy diagnostycznej złotego standardu, jakim jest inwazyjna biopsja wątroby.

3. Porównanie skuteczności terapii bezinterferonowej według schematu Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna, w grupie leczonej wstępnie interferonem i rybawiryną, do grupy uprzednio nieleczonej.

4. Wykazanie przydatności testów oceniających funkcje wątroby (LFT) poprzez przegląd wyników opublikowanych badań przedstawiających uszkodzenie wątroby u chorych na COVID-19.

Badaniem objętych zostało 70 pacjentów z przewlekłym WZW typu C leczonych schematem Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna, u których wykonano biopsję wątroby i oceniono stopień zwłóknienia w skali METAVIR. Część pacjentów (n=39), nie było wcześniej poddanych leczeniu, zaś 31 pacjentów było wcześniej nieskutecznie leczonych pegylowanym interferonem i rybawiryną (PEG INF + RBV). Każdy pacjent podlegał ocenie 2-krotnie: przed rozpoczęciem leczenia i po 12 tygodniach leczenia schematem Viekirax+Dezabuwir+Rybawiryna. Klasyfikacja stopnia zwłóknienia przeprowadzono według skali METAVIR. Nieinwazyjne pośrednie wskaźniki zwłóknienia wątroby (APRI, GAPRI, HAPRI, AP, indeks Forns, FIB-4, wskaźnik HUI) obliczone zostały na podstawie dostępnych w literaturze wzorów.

Do oceny uszkodzenia wątroby w przebiegu COVID-19 posłużyły tzw. testy funkcji wątroby (LFT). Są to głównie aktywności enzymów (AST, ALT, GGT, ALP, LDH), stężenie bilirubiny, albuminy i liczba płytek krwi. Wykazano, że poziom wirerii (HCV RNA) po 12 tygodniach leczenia schematem Viekirax + Dezabuwir+Rybawiryna był niewykrywalny w obu grupach. Zastosowane leczenie bezinterferonowe spowodowało wzrost odsetka wyników

przestawiających brak bądź umiarkowane włóknienie i spadek odsetka wyników wskazujących na zaawansowany włóknienie oraz marskość. Ponad to, zaobserwowaliśmy silną korelację biomarkerów (APRI, GAPRI, FIB-4) z wynikami elastografii na początku leczenia, która po 12 tygodniach leczenia dotyczyła już tylko GAPRI. Wartości nieinwazyjnych pośrednich biomarkerów włóknienia wątroby były niższe dla grupy nieleczonej w porównaniu z grupą wcześniej poddanej terapii PEG INF + RBV.

Krytyczny przegląd badań dotyczących infekcji SARS-CoV-2 potwierdza zmiany wartości testów oceniających funkcję wątroby (LFT), jednakże nie u wszystkich pacjentów. Wykazano, że nieprawidłowości w wartościach LFT wykazują silny związek z wiekiem i płcią pacjentów, oraz występowaniem chorób towarzyszących i zastosowanym modelem terapeutycznym. Oznaczenia LFT u chorych na COVID-19 są cennym źródłem informacji medycznej potrzebnej do prognozowania ciężkości choroby oraz rokowania. Zebrane badania mogą być również cenna informacją dla klinicystów pod względem doboru leczenia antyretrowirusowego.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM/SUMMARY

Percutaneous liver biopsy is still considered to be the gold standard of liver fibrosis. It is an invasive procedure and can lead to various complications. In addition, the test result may be biased due to the failure to obtain a representative sample. Recently, diagnostic methods alternative to liver biopsy have appeared, enabling the non-invasive diagnosis and monitoring of fibrosis. These include algorithms (formulas) composed of several laboratory tests and physical characteristics (AST, ALT, GGT, PLT, bilirubin, albumin, cholesterol and patient age, BMI). In contrast to liver biopsy, non-invasive tests can be performed repeatedly without prejudice and without the risk of health complications. Therefore, they are a very good diagnostic tool that allows to assess the dynamics of the liver fibrosis process in patients with chronic liver diseases, in particular in hepatitis C.

10. In addition, due to the spreading of SARS-CoV-2 virus pandemic and its pleiotropic activity, an important aspect is the assessment of the liver function in the course of infection. Assessment of the functional state of the liver is an important element of the diagnostic and therapeutic processes, due to the effect of the applied therapy of the basic disease and accompanying diseases on the metabolic processes in this organ.

Accordingly, the aim of this study was to:

1. Demonstrate the usefulness of non-invasive laboratory indicators of liver fibrosis in the assessment of the effectiveness of interferon-free treatment of chronic hepatitis C.
2. Compare the diagnostic value of non-invasive liver fibrosis indicators to the diagnostic value of the gold standard, which is an invasive liver biopsy.

3. Compare the efficacy of interferon-free therapy according to the Viekirax + Dezagabuvir + Ribavirin regimen, in the group initially treated with pegylated interferon and ribavirin (PEG INF + RBV), to the group not previously treated.

4. Demonstrate the usefulness of liver function tests (LFT) by reviewing the results of published studies showing liver damage in COVID-19 patients.

The study group consisted of 70 patients with chronic hepatitis C treated with the Viekirax + Dezagabuvir + Ribavirin regimen, who underwent a liver biopsy. Each patient was tested twice: before treatment initiation and after 12 weeks of treatment with the Viekirax + Dezagabuvir + Ribavirin regimen. The grading of the degree of fibrosis was carried out according to the METAVIR scale. Some patients (n=31) had previously been treated with PEG INF + RBV and some (n=39) had not been treated before. Non-invasive indirect indicators of liver fibrosis (APRI, GAPRI, HAPRI, AP, Forns' index, FIB-4, HUI index) were calculated on the basis of formulas available in the literature.

Liver function tests (LFTs) were used to assess liver damage in the course of COVID-19. These are mainly enzymes activities (AST, ALT, GGT, ALP, LDH), the concentrations of bilirubin and albumin, and platelet count. It has been shown that the viral load (HCV RNA) after 12 weeks of treatment with the Viekirax + Dezagabuvir + Ribavirin regimen was undetectable in both groups. The interferon-free treatment increased the percentage of results indicating no or moderate fibrosis and decreased the percentage of results indicating advanced fibrosis and cirrhosis. Moreover, we observed a strong correlation of noninvasive biomarkers (APRI, GAPRI, FIB-4) with the results of elastography at the beginning of the treatment. The values of non-invasive intermediate biomarkers

of liver fibrosis were lower for the untreated group compared to the group previously treated with PEG INF + RBV.

A critical review of SARS-CoV-2 infection studies confirms changes in liver function tests (LFTs), but not in all patients. It was shown that the abnormalities in LFT values showed a strong correlation with age and sex of the patients, as well as the incidence of comorbidities and the therapeutic model used. The determinations of LFT in patients with COVID-19 are a valuable source of medical information for assessing the severity of the disease and disease prognosis. The conclusions of this literature review may also be valuable information for clinicians in terms of the selection of anti-retroviral therapy.

10. KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W CYKL ROZPRAWY DOKTORSKIEJ


10.1.1. Praca oryginalna

Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, Golaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C. *Journal of Clinical Medicine*, 2021; 10(17):3951.

Punktacja IF: 4,242; MNiSW: 140

Article

Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C

Dagmara Przekop¹, Jakub Klapaczynski², Agnieszka Grytczuk³, Ewa Gruszevska⁴ , Andrzej Gietka², Anatol Panasiuk^{5,6}, Sławomir Golaszewski⁷, Bogdan Cylwik⁸ and Lech Chrostek^{4,*}

- ¹ Diagnostics-Experimental Center of Sexually Transmissible Diseases, 15-879 Białystok, Poland; dagmara.przekop@o2.pl
 - ² Department of Internal Diseases and Hepatology, Central Clinical Hospital of Ministry of Home Affairs and Administration, 02-507 Warszawa, Poland; jklapaczynski@hepatolodzy.pl (J.K.); andrzejgietka@o2.pl (A.G.)
 - ³ Department of Laboratory Diagnostics, University Clinical Hospital in Białystok, 15-540 Białystok, Poland; agnieszka.grytczuk@onet.eu
 - ⁴ Department of Biochemical Diagnostics, Medical University of Białystok, 15-269 Białystok, Poland; ewa.gruszevska@umb.edu.pl
 - ⁵ Department of Internal Diseases and Gastroenterology, Provincial Welded Hospital in Białystok, 15-950 Białystok, Poland; anatol@panasiuk.pl
 - ⁶ Department of Clinical Medicine, Medical University of Białystok, 15-254 Białystok, Poland
 - ⁷ Department of General, Minimally Invasive and Oncological Surgery, Provincial Welded Hospital in Białystok, 15-950 Białystok, Poland; slawekg1966@gmail.com
 - ⁸ Department of Pediatric Laboratory Diagnostics, Medical University of Białystok, 15-274 Białystok, Poland; cylwikb@umb.edu.pl
- * Correspondence: chrostek@umb.edu.pl; Tel./Fax: +48-85-831-85-85



Citation: Przekop, D.; Klapaczynski, J.; Grytczuk, A.; Gruszevska, E.; Gietka, A.; Panasiuk, A.; Golaszewski, S.; Cylwik, B.; Chrostek, L. Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3951. <https://doi.org/10.3390/jcm10173951>

Academic Editor: Yasuhito Tanaka

Received: 14 July 2021

Accepted: 28 August 2021

Published: 31 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The effectiveness of interferon-free therapy during the course of HCV infection has already been confirmed. Liver fibrosis can be assessed in several ways, from biopsies to imaging tests. The present study evaluates the usefulness of non-invasive indirect biomarkers of liver fibrosis (APRI, GAPRI, FORNS, FIB-4, the AP index and HUI score) as markers of the effective treatment of HCV with the 3D regimen. Blood samples were collected from 70 patients suffering from chronic hepatitis C. Patients received the 3D AbbVie regimen for hepatitis C. All patients had HCV genotype 1b. The APRI, GAPRI, FIB-4, FORNS, HUI and AP index (age–platelet score) values were calculated with their respective algorithms. The stage of fibrosis was evaluated on the basis of a liver biopsy and confirmed by FibroScan-based transient elastography. An undetectable level of HCV RNA after 12 weeks of treatment with the 3D regimen indicates 100% eradication of hepatitis C virus. After the treatment, non-invasive indirect markers of liver fibrosis achieved levels below the limit for significant fibrosis. Thus, non-invasive indirect biomarkers of hepatic fibrosis failed to detect the presence of significant fibrosis, which was proved in histopathological examination. However, the eradication of hepatitis C virus by means of the 3D regimen treatment does not mean that patients were completely cured.

Keywords: hepatitis C; 3D regimen; HCV eradication; non-invasive fibrosis markers

1. Introduction

The treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) infection has been revolutionized in recent years [1]. The introduction of direct-acting antiviral agents (DAAs) that target different viral functions, instead of interferon-based regimens, has increased the rates of sustained virologic response after 12 weeks of therapy (SVR12) in HCV-infected patients without cirrhosis or with compensated cirrhosis to 94–97% [2]. The new therapeutic regimen for the treatment of chronic HCV infection consists of two pills: one tablet called Viekirax/Exviera in Europe, comprising of the NS5A inhibitor ombitasvir, the protease inhibitor paritaprevir and cytochrome P3A inhibitor ritonavir; and a second tablet with

non-nucleoside polymerase inhibitor dasabuvir (DSV) [3]. The combination of this three-drug regimen plus dasabuvir was developed by AbbVie and Enanta (AbbVie, Inc., North Chicago, IL, USA, and Enanta Pharmaceuticals, Inc., Watertown, MA, USA) and, together, they are known as the 3D regimen [4]. This is the new standard of care for patients infected with HCV and is currently approved for the treatment of HCV genotype 1 (with DSV) and genotype 4 (without DSV) in the USA and Europe [5]. A regulatory committee has recommended that the European Medicines Agency (EMA) approve AbbVie's 3D regimen, with or without ribavirin, to treat genotypes 1 and 4 of the hepatitis C virus. The most recent recommendations on the treatment of hepatitis C were prepared in 2018 [6].

The traditional and benchmark tool to evaluate liver fibrosis and cirrhosis is liver biopsy. However, this method has significant limitations—among many others, its invasiveness, risk of complications and inability to monitor disease progression [7]. For this reason, several noninvasive serum markers have been developed on the basis of serum tests. Their superiority to liver biopsy rests on their non-invasiveness and the possibility of repeated use, as liver fibrosis is a dynamic process. Changing levels can be monitored with laboratory tests, which can be pooled in panels known as non-invasive serum biomarkers of liver fibrosis [8].

In this study, we evaluated six indirect, non-invasive biomarkers of liver fibrosis (APRI, GAPRI, Forns, FIB-4, Age-Platelet and HUI score) as markers of the effective treatment of HCV with the 3D regimen. Additionally, we assessed the difference in fibrosis reversal between patients who only received the 3D regimen (the naïve group) and those who had been pre-treated prior to the administration of interferon-free therapy (the experienced group).

2. Materials and Methods

2.1. Patients

The study included 70 patients suffering from the hepatitis C virus: 32 women with a mean age of 54 (range: 27–74 y) and 38 men with a mean age of 48 (range: 24–81 y). The study recruited patients referred by GPs with diagnosed HCV infection. A total of 39 patients did not receive any treatment before the study and were called the “naïve” group, and 31 patients received treatment before the 3D AbbVie regimen and were named the “experienced” group. Pre-treatment therapy included pegylated interferon- α and ribavirin (PEG INF + RBV). Patients were interviewed about drinking alcohol and none of them abused. Their declared weekly alcohol consumption was less than 2 standard drinks (1 standard drink was defined as 14 g of pure alcohol). All subjects gave informed consent before they participated in the study. This study was in accordance with the Helsinki Declaration and was approved by the Bioethical Committee at the Medical University of Białystok.

2.2. Blood Sampling

Blood samples from each patient were collected from a peripheral vein. After centrifugation, sera were collected in 2 tubes and stored at -86°C until assayed. Besides serum, a part of each blood sample was collected in tubes containing 3.8% liquid sodium citrate and EDTA-2.

2.3. Diagnosis

The diagnosis was based on clinical data: signs, symptoms, physical exams and abdominal ultrasound or abdominal CT, laboratory tests (the biochemical liver panel: PLT, MCV, AST, ALT, GGT, albumin, bilirubin and cholesterol) and a liver biopsy. Liver biopsies were performed percutaneously using ultrasound guidance. Liver biopsies were performed using Hepafix 1.6 mm (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) with two passages. The obtained material was 12–26 mm long and contained 6–14 portal spaces. Liver biopsies were assessed by a histopathologist specializing in hepatology. Each liver biopsy was accompanied by a protocol with complete clinical information about the patient.

Histopathological examination showed no other significant changes apart from fibrosis and inflammation of the liver tissue.

The obtained 20 mm biopsy specimens included 1–12 portal tracts. To evaluate the stage of fibrosis, we used METAVIR classification on the basis of the results of elastography. The FibroScan scoring system enabled us to present fibrosis results as not only total but also transitional scores (F0–F1, F1–F2, F2–F3 and F3–F4). We assumed that such subpopulations of patients would enable fibrosis to be more accurately assessed. Significant fibrosis and cirrhosis were defined as stages F2–F4 and F4, respectively. Each patient also had vibration-controlled transient elastography (VCTE) utilizing FibroScan (FibroScan 502 Touch; EchoSens, Paris, France) performed by physicians trained and certified by the manufacturer. The biopsies were evaluated by the same histopathologist. The liver stiffness measurement (LSM) was expressed in kilopascals (kPa). Before examination, each patient was asked not to consume any liquids or solids for a minimum of 3 h before the test. The scan typically took 10 to 15 min. To confirm the diagnosis of hepatitis C, anti-HCV tests were performed by a third-generation EIA (Ortho-Diagnostic Systems).

2.4. Treatment

A total of 70 HCV-infected patients received the 3D AbbVie regimen for hepatitis C. The 3D regimen (marketed as Viekirax/Exviera in Europe) consists of the HCV protease inhibitor paritaprevir (75 mg) boosted with ritonavir (50 mg), the NS5A inhibitor ombitasvir (12.5 mg) and the NS5B polymerase inhibitor dasabuvir (250 mg). Patients received a 12-week regimen consisting of a single tablet co-formulation of ritonavir-boosted paritaprevir and ombitasvir (at a once daily dose of 150 mg paritaprevir, 100 mg ritonavir and 25 mg ombitasvir) and dasabuvir (250 mg twice daily). The primary goal was a sustained virological response 12 weeks after the end of treatment (SVR12). All examinations (including the biopsy, LSM (liver stiffness measure), HCV RNA detection and quantification and laboratory tests for biomarkers) were conducted twice: before the 3D regimen (point 0) and after 12 weeks (point 12).

2.5. Laboratory Testing

AST, ALT, GGT, albumin, cholesterol and bilirubin were determined on a Cobas c501 Analyzer (Hitachi, Tokyo, Japan). The PLT count was measured on a Sysmex XS-800i (Sysmex Corporation, Singapore).

Calculations of non-invasive indirect fibrosis biomarkers:

$$\text{APRI} = (\text{AST [IU/L]}/\text{ULN})/(\text{PLT [10}^9\text{/L]}) * 100 \text{ [9]}$$

*ULN, AST upper level of normal (50 IU/L)

$$\text{GAPRI} = (\text{GGT [IU/L]}/\text{ULN})/(\text{PLT [10}^9\text{/L]}) * 100 \text{ [10]}$$

*ULN, GGT upper level of normal (40 IU/L for women, 75 IU/L for men)

$$\text{FIB-4} = (\text{age [y]} * \text{AST [IU/L]})/(\text{PLT [10}^9\text{/L]} * \sqrt{\text{ALT [IU/L]}} \text{ [11]}$$

$$\text{Forn's index} = 7.811 - 3.131 \ln(\text{PLT [10}^9\text{/L]}) + 0.781 \ln(\text{GGT [IU/L]}) + 3.467 \ln(\text{age} - 0.014(\text{cholesterol [mg/dL]}) \text{ [12]}$$

$$\text{AP index} = \text{age [y]} + \text{PLT (age: } <30 = 0; 30-39 = 1; 40-49 = 2; 50-59 = 3; 60-69 = 4; \geq 70 = 5, \text{ [13]}$$

$$\text{PLT [} \times 10^9\text{/L]: } \geq 225 = 0; 200-224 = 1; 175-199 = 2; 150-174 = 3; 125-149 = 4; <125 = 5 \text{ [13]}$$

$$\text{HUI score} = 3.138 + 0.167 \times \text{BMI} + 0.088 \times \text{bilirubin [mg/dL]} - 0.151 \times \text{albumin [g/dL]} - 0.019 \times \text{PLT [10}^9\text{/L]} \text{ [14].}$$

2.6. Detection and Quantification of HCV RNA

The detection of HCV (viremia) and quantification of HCV genotypes was conducted with a qualitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using a fully automated Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV, test version 2.0 (CAP/CTM HCV; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). In this system, the Cobas AmpliPrep performs an automated extraction and the Cobas TaqMan device performs automated real-time PCR amplification and quantification. The lower limit of detection of HCV is 15 IU/mL. All patients had HCV genotype 1b.

2.7. Statistical Analysis

The normality of distribution was ascertained by means of the Kolmogorov–Smirnov test with the Lilliefors correction. The analysis revealed that the distribution of tests did not follow a normal distribution ($p < 0.05$). To compare two related samples (point 0 and point 12) we used the Wilcoxon signed-rank test. The differences between the experienced and naïve groups were evaluated using the Mann–Whitney U test. The correlation between FibroScan results and non-invasive indirect markers of liver fibrosis variables was assessed using Spearman’s rank correlation coefficient. We considered p -values of <0.05 as statistically significant.

3. Results

There was no significant difference ($p = 0.917$) between viremia in experienced and naïve patients at the start of treatment (point 0) and after 12 weeks of treatment (point 12) (Table 1). There was also no significant difference in liver stiffness measurement between naïve and experienced patients at point 0 of the study ($p = 0.376$) and at point 12 ($p = 0.390$). Interestingly, there were significant differences in liver stiffness in the group of experienced patients between point 0 and 12 of the study ($p = 0.043$) and no significant difference in the naïve group between point 0 and 12 ($p = 0.081$).

Table 1. Characteristics of HCV-infected patients.

	Sex/ Week of Treatment	Treatment	Median	Minimum	Maximum	<i>p</i>
Sex	Women <i>n</i> = 32	Experienced	62	35	69	0.056
		Naïve	46	27	74	
	Men <i>n</i> = 38	Experienced	50	30	81	0.399
		Naïve	43	24	77	
BMI [kg/m ²]	Women <i>n</i> = 32	Experienced	27.0	22.5	43.1	0.027 ^a
		Naïve	23.6	20.4	30.8	
	Men <i>n</i> = 38	Experienced	26.2	12.9	30.5	0.690
		Naïve	26.0	22.3	33.6	
Viremia [IU/mL]	0	Experienced	853,000	20,300	8,507,396	0.917 ^a
			12	ND	ND	
	0	Naïve	943,000	31	111,400,000	
			12	ND	ND	
FibroScan [kPa]	0	Experienced	8.4	3.7	32.8	0.273 ^a
			12	7.0	3.3	
	0	Naïve	6.6	2.8	69.1	0.081 ^b
			12	6.6	3.5	

Notes: “^a” in superscript—the comparison between the experienced and naïve groups at point 0; “^b” in superscript—the comparison between point 0 and 12 in the experienced and the naïve group; “^c” in superscript—the comparison between the experienced and the naïve group at point 12. * statistically significant difference in Mann–Whitney U test. Abbreviations: W, women; M, men; 0, start of the 3D regimen treatment; 12, after 12 weeks of the 3D regimen treatment; BMI, body mass index; ND, not detectable viremia.

The activities of liver enzymes (AST, ALT and GGT) significantly decreased after 12 weeks of treatment with AbbVie’s 3D regimen in the naïve and experienced groups ($p < 0.001$ for all comparisons) (Table 2). The concentrations of total bilirubin and cholesterol did not change after 12 weeks of AbbVie’s 3D regimen in the naïve and experienced groups of HCV patients ($p > 0.05$ for all comparisons). The number of platelets significantly increased in the naïve patients after 12 weeks of AbbVie’s 3D regimen ($p = 0.002$). We no-

ticed a significantly increased concentration of albumin in the naïve patients after AbbVie’s 3D regimen ($p = 0.038$).

Table 2. Changes in biochemical parameters in HCV treatment patients.

	Treatment	Week	Median	Minimum	Maximum	<i>p</i>
ALT [IU/L]	Experienced <i>n</i> = 31	0	60	14	94	0.000 *
		12	19	5	39	
	Naïve <i>n</i> = 39	0	56	17	290	0.000 *
		12	20	10	44	
AST [IU/L]	Experienced <i>n</i> = 31	0	47	26	96	0.000 *
		12	21	14	58	
	Naïve <i>n</i> = 39	0	45	19	309	0.000 *
		12	21	11	41	
GGT [IU/L]	Experienced <i>n</i> = 31	0	64	14	365	0.000 *
		12	25	10	70	
	Naïve <i>n</i> = 39	0	47	11	215	0.000 *
		12	19	9	32	
BIL [μmol/L]	Experienced <i>n</i> = 31	0	10.3	4.3	35.9	0.304
		12	10.3	4.4	17.1	
	Naïve <i>n</i> = 39	0	8.6	3.8	31.5	0.667
		12	7.7	4.4	41.7	
PLT [×10 ⁹]	Experienced <i>n</i> = 31	0	189	64	450	0.299
		12	187	44	427	
	Naïve <i>n</i> = 39	0	216	37	431	0.002 *
		12	229	64	409	
ALB [g/L]	Experienced <i>n</i> = 31	0	39	26.7	5	0.038 *
		12	43.0	36.0	47.8	
	Naïve <i>n</i> = 39	0	39	31.6	48.4	0.346
		12	39	31.6	50	
CHOL [mmol/L]	Experienced <i>n</i> = 31	0	4.78	2.63	7.75	0.983
		12	4.65	3.04	6.14	
	Naïve <i>n</i> = 39	0	4.58	2.52	7.75	0.809
		12	4.58	2.73	7.02	

* statistically significant difference in Mann–Whitney U test.

After 12 weeks of AbbVie’s 3D regimen, we observed an increase in the number of low scores on the METAVIR scale, as follows: the prevalence of the score F0–F1 increased from 47.1 to 60% after treatment, the score of F1 increased from 1.4 to 7.1% and the score of F1–F2 from 11.4 to 14.3%. There was a parallel increase in the prevalence of the highest stage of liver fibrosis: from 21.4% before treatment to 11.4% after AbbVie’s 3D regimen (Table 3).

The value of APRI decreased significantly, by about 2.2 times, after AbbVie’s 3D regimen in the naïve patients ($Z = 4.379$; $p < 0.001$) and by about 4.2 times in the experienced group ($Z = 5.227$; $p < 0.001$). The value of GAPRI similarly decreased by about 2.8 times after AbbVie’s 3D regimen in the naïve patients ($Z = 4.508$; $p < 0.001$) and by about 3.7 times in the experienced group ($Z = 5.303$; $p < 0.001$) (Figure 1a). FIB-4 and Forn’s index also

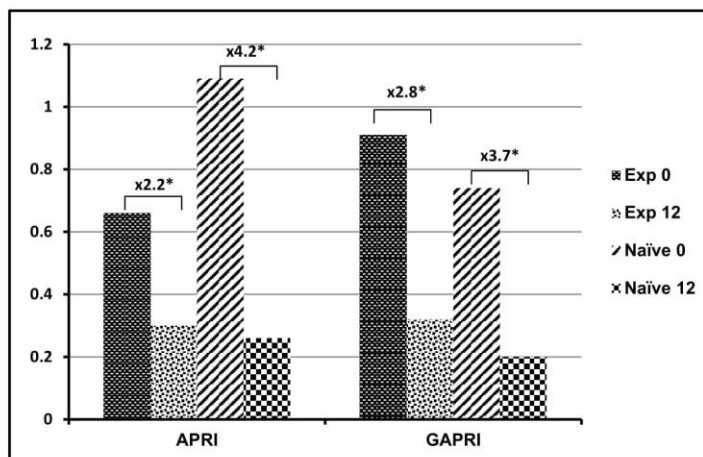
significantly decreased in the naïve and experienced patients after AbbVie’s 3D regimen, but the differences were not high as for APRI and GAPRI (Figure 1b). In the experienced group, FIB-4 decreased by around 33% ($Z = 2.887$; $p = 0.004$) and Forn’s index by 14% ($Z = 3.708$; $p < 0.001$). In the naïve group, FIB-4 decreased by around 96% ($Z = 4.413$; $p < 0.001$) and Forn’s index by around 14% ($Z = 5.227$; $p < 0.001$). The AP index decreased only in naïve patients, by around 11% ($Z = 2.578$; $p = 0.009$), and HUI only in the experienced group, by around 6% ($Z = 1.978$; $p = 0.048$).

Table 3. The frequency of fibrosis stages before (week 0) and after AbbVie’s 3D regimen (week 12).

METAVIR Score	Week 0 <i>n</i> (%)	Week 12 <i>n</i> (%)
F0–F1	33 (47.1)	42 (60)
F1	1 (1.4)	5 (7.1)
F1–F2	8 (11.4)	10 (14.3)
F2	4 (5.7)	0 (0)
F2–F3	1 (1.4)	0 (0)
F3	5 (7.1)	5 (7.1)
F3–F4	1 (1.4)	0 (0)
F4	15 (21.4)	8 (11.4)
Total	70 (100)	70 (100)

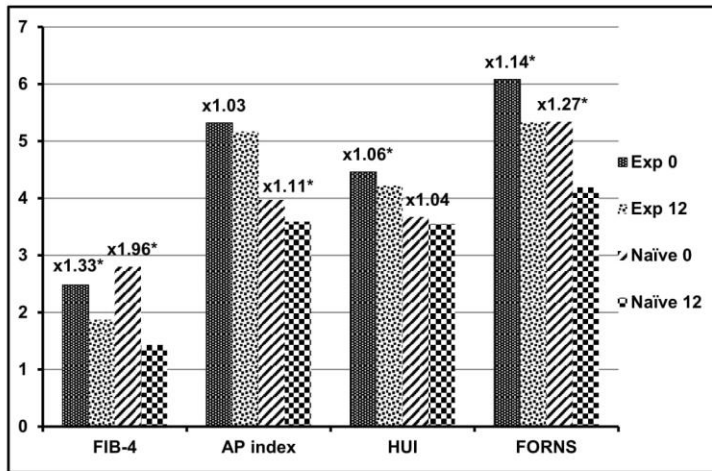
Abbreviations: F0–F4, stages of fibrosis in METAVIR scale, *n*: number of patients.

When compared, the values of tested biomarkers between the naïve and experienced groups at point 0 and point 12 of the treatment only differed on the AP index at point 0, but by the end of treatment there were significant differences for FIB-4, the AP index and FORNS (Table 4).



(a)

Figure 1. Cont.



(b)

Figure 1. The value of non-invasive indirect biomarkers of liver fibrosis before and after 3D regimen treatment of HCV in the experienced and naïve groups of patients. (a) tests with multiple value changes (b) tests with little or no change in value. Exp—treatment experienced group; Naïve—treatment naïve group; 0—start of treatment; 12—12 weeks after start of treatment. The numbers show multiple increases in the groups from baseline (point 0) after 12 weeks of treatment; * statistically significant differences between point 12 and 0 in experienced and naïve group.

Table 4. Comparisons of non-invasive indirect biomarkers of liver fibrosis between treatment experience and treatment naïve group at point 0 and point 12.

Test	Treatment	Point 0	Comparison 1	Point 12	Comparison 1	Comparison 2	Cut-Off [Ref.]
APRI	Experienced	0.66 ± 0.53	Z = -0.827	0.30 ± 0.26	Z = -1.382	p = 0.003	≤0.5
	Naïve	1.09 ± 2.71	p = 0.408	0.26 ± 0.25	p = 0.167	p = 0.007	[15]
GAPRI	Experienced	0.91 ± 0.83	Z = -0.943	0.32 ± 0.36	Z = -1.305	p < 0.001	0.52
	Naïve	0.74 ± 0.77	p = 0.346	0.19 ± 0.14	p = 0.192	p < 0.001	[16]
FIB-4	Experienced	2.48 ± 2.04	Z = -1.459	1.87 ± 1.63	Z = -2.093	p = 0.421	<1.45
	Naïve	2.80 ± 4.37	p = 0.144	1.43 ± 1.28	p = 0.036 *	p = 0.234	[17]
AP index	Experienced	5.32 ± 2.48	Z = -2.014	5.17 ± 2.22	Z = -2.519	p = 0.704	<4
	Naïve	3.97 ± 2.81	p = 0.044 *	3.59 ± 2.56	p = 0.012 *	p = 0.816	[18]
HUI	Experienced	4.46 ± 2.37	Z = -1.648	4.22 ± 1.97	Z = -1.795	p = 0.733	5.54
	Naïve	3.67 ± 2.19	p = 0.100	3.55 ± 2.47	p = 0.073	p = 1.0	[19]
FORNS	Experienced	6.08 ± 2.00	Z = -1.434	5.32 ± 1.92	Z = -2.196	p = 0.517	<4.21
	Naïve	5.34 ± 2.62	p = 0.152	4.19 ± 2.25	p = 0.028 *	p = 0.060	[20]

Comparison 1 between experienced and naïve groups was performed with the Mann-Whitney U test between week 0 and week 12 and comparison 2 was performed with a chi-squared test for trends. * statistically significant difference. Cut-offs were taken from references given in square brackets.

When variations of non-invasive biomarkers from week 0 to week 12 were compared, significant trends were observed for APRI and GAPRI. This implies that values of these tests below the cut-off for significant fibrosis are more likely after treatment in both groups.

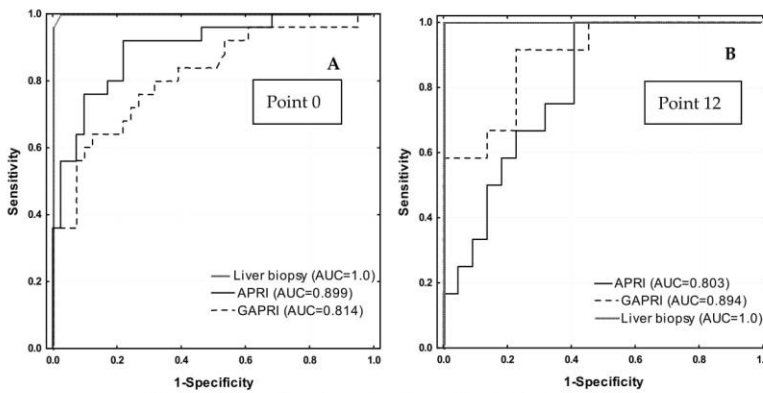
All non-invasive indirect biomarkers of liver fibrosis correlated moderate with FibroScan results at the beginning of the treatment ($p < 0.001$ for all indicators) but weakly at the end of the therapy ($R < 0.4$), except for GAPRI, which correlated strongly at the end of therapy (Table 5).

Table 5. Correlation between FibroScan results and non-invasive indirect markers of liver fibrosis at point 0 and point 12 of the study.

Test	FibroScan at Point 0	FibroScan at Point 12
APRI	R = 0.744 * ($p < 0.001$)	R = 0.664 * ($p < 0.001$)
FIB-4	R = 0.736 * ($p < 0.001$)	R = 0.611 * ($p < 0.001$)
FORNS	R = 0.704 * ($p < 0.001$)	R = 0.647 * ($p < 0.001$)
AP index	R = 0.643 * ($p < 0.001$)	R = 0.590 * ($p < 0.001$)
HUI	R = 0.662 * ($p < 0.001$)	R = 0.561 * ($p = 0.001$)
GAPRI	R = 0.509 * ($p < 0.001$)	R = 0.701 * ($p < 0.001$)

R—Spearman correlation coefficient; * statistically significant correlation.

The diagnostic power of non-invasive fibrosis tests which values change are presented in Figure 2. As expected, the AUCs at point 0 for APRI and GAPRI for the differentiation of significant and non-significant fibrosis were significantly lower than those for the FibroScan and biopsy ($p = 0.019$ and $p < 0.001$, respectively) (Figure 2A). At time 12, the AUCs for these tests did not differ significantly (Figure 2B). However, the AUCs for APRI and GAPRI for the differentiation of fibrosis and cirrhosis were significantly lower than those for the FibroScan and biopsy at point 0 ($p = 0.021$ for APRI and $p < 0.001$ for GAPRI) (Figure 2C) and 12 ($p < 0.001$ for APRI and GAPRI) (Figure 2D).



Non-significant fibrosis vs. significant fibrosis ($F < 2$ vs. $F \geq 2$).

Figure 2. Cont.

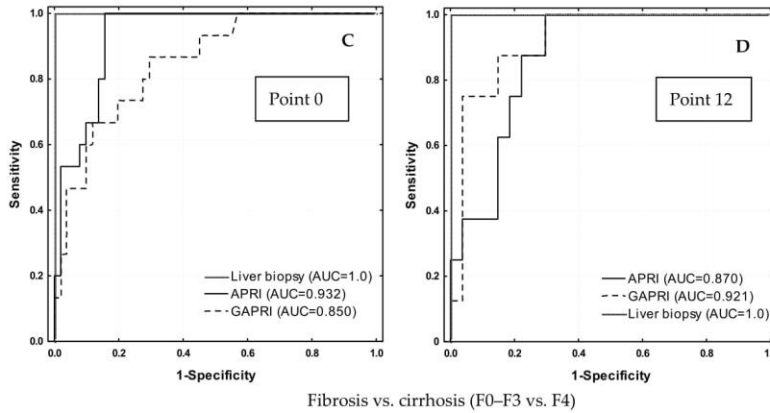


Figure 2. The comparison ROC curves for BIOPSY, APRI and GAPRI between non-significant fibrosis ($F < 2$) and significant fibrosis ($F \geq 2$) at point 0 (A) and 12 (B), and between fibrosis (F0-F3) and cirrhosis ($F = 4$) at point 0 (C) and 12 (D).

4. Discussion

This study verified that a 3D regimen efficiently eliminates HCV RNA in all tested patients. It confirms the effectiveness of 3D therapy and that testing viremia by means of HCV RNA is the best way to prove therapeutic success. It implies that sustained virologic response rates at 12 weeks post-treatment (SVR12) were achieved in pretreatment and non-pretreatment patients, and non-cirrhotic and cirrhotic patients with genotype 1b HCV [1–3,20–23]. Undetectable levels of HCV RNA after 12 weeks of treatment prove 100% eradication of the hepatitis C virus. However, this does not mean that patients were completely cured. In order to verify this hypothesis, we performed another liver biopsy. This was performed after treatment, at the same time as the elastography and non-invasive indicators of liver fibrosis were assessed. Looking at the results of the biopsy after 12 weeks of treatment, it is possible to draw conclusions about the need for further liver fibrosis therapy. The proportion of cases with significant fibrosis ($\geq F2$) only decreased from 30% at the beginning of therapy to 18.5% at the end of medication. Therefore, after efficient eradication of HCV infection with the 3D regimen, there is still a need to continue medication to reverse fibrosis—a change from causal to symptomatic treatment. It also implies that 12 weeks after treatment with the 3D regimen is too short a time for full regression of fibrosis, especially in cases with cirrhosis (F4), in which case a reduction in cirrhosis was observed in half of the patients (decrease from 21.4 to 11.4%). The other patients with cirrhosis experienced no change in the severity of the disease. Our results indicate that only two tests, APRI and GAPRI, reached values lower than the cut-off for significant fibrosis in the experienced and naive groups. These results are inconsistent with the results of the elastography and biopsy. Therefore, these tests cannot be used as predictors for fibrosis change. An indirect proof of this is the variation of these tests from week 0 to week 12, in which a chi-squared test for trend analysis showed a significant decreasing trend in APRI and GAPRI values over time in both study groups. The analysis of the ROC curves shows that both APRI and GAPRI can be useful in the diagnosis of liver fibrosis, as AUCs obtained values above 0.8. However, the diagnostic power of both of these tests was significantly lower than that of the liver biopsy and FibroScan for discriminating between non-significant and significant fibrosis. While at point 0 APRI showed higher diagnostic accuracy, at point 12 GAPRI had a higher accuracy, both for discriminating non-significant from significant fibrosis and for cirrhosis fibrosis.

Two systems were used to assess fibrosis: the first, the METAVIR scoring system, which evaluates fibrosis by histopathological examination (biopsy) [15,16]; the second, vibration-controlled transient elastography (VCTE) utilizing FibroScan, which measures liver stiffness (LSM) in a volume a hundredfold greater than that obtained by needle biopsy [17,18]. Both techniques evaluate morphological changes in liver parenchyma. Parallel to the morphological studies of liver parenchyma, we also examined changes in non-invasive indirect biomarkers of liver fibrosis. The formulae of these tests of hepatic fibrosis involve enzymes (both aminotransferases and γ -glutamyl transferase) that are not only indicators of hepatocyte damage but also of the inflammation of liver tissue [19]. These are APRI (containing AST), GAPRI (containing GGT) and FIB-4 (containing AST and ALT). In our opinion, the presence of these enzymes in the biomarker formulae are the main cause of the highest changes in APRI, GAPRI and FIB-4 values after 12 weeks of treatment. This implies that after that time the inflammatory process in the liver was extinguished. At the start of treatment, when inflammation was the strongest, all the biomarkers strongly correlated with liver stiffness (FibroScan) and after 12 weeks of treatment this correlation decreased with the exception of the correlation with GAPRI, which increased. It is very satisfying that the value of tested non-invasive indirect markers of liver fibrosis after 12 weeks of treatment reached a value below the cut off for significant fibrosis, especially in the naïve group [9–12,24,25]. The mean values of APRI and GAPRI at the end of treatment in both the naïve and experienced groups were below the cut-off values for significant fibrosis [9,10]. FIB-4, FORNS and the AP index obtained these values only in the naïve group [11,24,25]. It is noteworthy that the mean values of LSM (FibroScan) in each subgroup did not cross the border for insignificant fibrosis, which is 7.1 kPa [26]. These values track the range of severe fibrosis (more than 9.6 kPa and below 12.5kPa). This implies a greater harmony with liver biopsy than with the other non-invasive biomarkers.

We also noticed that the biomarker values after 12 weeks of treatment were generally lower in the naïve than the experienced group, with statistically significant differences for FIB-4, FORNS and the AP index. However, this was not dependent on the mean values of markers at the start of the treatment, as for APRI and FIB-4 the mean values at the start of therapy were higher in the naïve group than the experienced group, but for the remaining indicators there was an inverse relationship. Generally, the non-invasive indirect biomarkers of liver fibrosis that contain other enzyme components, i.e., cholesterol (FORNS), bilirubin and albumin (HUI), or platelets alone (AP index), changed only marginally. We can see that the concentration of total cholesterol did not change after medication. This is one of the components of the FORNS formula, and therefore the changes in this marker are related to changes in GGT and platelets. However, platelets changed only for the naïve group. There were also no changes in bilirubin concentration, which is a component of the HUI formula. The changes in HUI value could have been related to albumin and platelets. However, albumin changed only in the experienced group and thus that change could explain the change in HUI in this group of patients only. The change in the AP index in the naïve group only was linked with the change in the number of platelets, which occurred in this group of patients only. To summarize, the changes in the values of the biomarkers of liver fibrosis can be explained by changes at the level of their components.

The time span of observation is a limitation of this study. Looking at these results, we are aware that to observe a fibrosis regression a follow-up period longer than 12 weeks would be needed. Beyond this, it is expected that DAAs would allow HCV eradication, while liver fibrosis regression takes longer, despite the clear normalization of liver tests on the part of non-invasive fibrosis markers.

5. Conclusions

In conclusion, we can state that after the treatment of hepatitis C virus with the 3D regimen, the values of non-invasive indirect markers of liver fibrosis achieved levels below the limit for significant fibrosis. Though the non-invasive indirect biomarkers of

hepatic fibrosis were highly correlated with stiffness, they failed to indicate the presence of significant fibrosis, which was proved in histopathological examination by means of a liver biopsy and FibroScan. This implies that these markers did not provide reliable data.

Author Contributions: Conceptualization, D.P., J.K. and L.C.; laboratory investigation, D.P., A.G. (Agnieszka Grytczuk), E.G. and B.C.; data curation, J.K., A.G. (Andrzej Gietka), A.P. and S.G.; writing—original draft preparation, D.P., A.G. (Agnieszka Grytczuk) and E.G.; writing—review and editing, B.C. and A.P.; supervision, L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We have received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Medical University in Białystok, Poland (protocol code R-I-002/461/214).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data sharing not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ALT: alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; DAAs, direct-acting antiviral agents; DSV, dasabuvir; EMA, European Medicines Agency; GGT, γ -glutamyl transferase; LSM, liver stiffness measure; MCV, mean corpuscular volume; PEG INF + RBV, pegylated interferon- α and ribavirin; PLT, platelets; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; SVR12, sustained virologic response after 12 weeks of therapy; VCTE, vibration-controlled transient elastography.

References

- Bertino, G.; Ardiri, A.; Proiti, M.; Rigano, G.; Frazzetto, E.; Demma, S.; Ruggeri, M.I.; Scuderi, L.; Malaguamera, G.; Bertino, N.; et al. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. *World J. Hepatol.* **2016**, *8*, 92–106. [CrossRef]
- Ahmed, H.; Abushouk, A.I.; Menshawy, A.; Mohamed, A.; Negida, A.; Loutfy, S.A.; Abdel-Daim, M.M. Safety and Efficacy of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir and Dasabuvir with or without Ribavirin for Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 1: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Drug. Investig.* **2017**, *37*, 1009–1023. [CrossRef]
- ASLD/IDSA HCV guidance panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology* **2015**, *62*, 932–954. [CrossRef]
- AbbVie Corporation. Product Monograph Including Patient Medication Information PrHOLKIRA™ PAK. AbbVie Corporation. 2016. Available online: http://www.abbvie.ca/content/dam/abbviecorp/ca/english/docs/HOLKIRA_PAK_PM_EN.pdf (accessed on 22 April 2016).
- EMA. EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment Report. Exviera. International Non-Proprietary Name: Dasabuvir. Procedure No. EMEA/H/C/003837/0000. Available online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessmen (accessed on 17 April 2016).
- European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 461–511. [CrossRef]
- Cadranel, J.F.; Rufat, P.; Degos, F. Practices of liver biopsy in France: Results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology* **2000**, *32*, 477–481. [CrossRef]
- Stauber, R.E.; Lackner, C. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 4287–4294. [CrossRef]
- Wai, C.T.; Greenon, J.K.; Fontana, R.J.; Kalbfleisch, J.D.; Marrero, J.A.; Conjeevaram, H.S.; Lok, A.S. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **2003**, *38*, 518–526. [CrossRef] [PubMed]
- Vardar, R.; Vardar, E.; Demiri, S.; Sayhan, S.E.; Bayol, U.; Yildiz, C.; Postaci, H.; Vardar, E.; Demiri, S.; Sayhan, S.E.; et al. Is there any non-invasive marker replace the needle liver biopsy predictive for liver fibrosis, in patients with chronic hepatitis. *Hepatogastroenterology* **2009**, *56*, 1459–1465.
- Vallet Pichard, A.; Mallet, V.; Nalpas, B.; Verkarre, V.; Nalpas, A.; Dhalluin Venier, V.; Fontaine, H.; Pol, S. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and Fibrotest. *Hepatology* **2007**, *46*, 32–36. [CrossRef]

12. Forns, X.; Ampurdanes, S.; Llovet, J.M.; Aponte, J.; Quinto, L.; Martinez-Bauer, E.; Bruguera, M.; Sanchez-Tapias, J.M.; Rodes, J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* **2002**, *4*, 987–992.
13. Poynard, T.; Bedossa, P. Age and platelet count: A simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus. METAVIR and CLINIVIR Cooperative Study Groups. *J. Viral. Hepatol.* **1997**, *4*, 199–208. [[CrossRef](#)]
14. Hui, A.Y.; Chan, H.L.; Wong, V.W.; Liew, C.T.; Chim, A.M.; Chan, F.K.; Sung, J.J. Identification of chronic hepatitis B patients without significant liver fibrosis by a simple noninvasive predictive model. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100*, 616–623. [[CrossRef](#)]
15. Spycher, C.; Zimmermann, A.; Reichen, J. The diagnostic value of liver biopsy. *BMC Gastroenterol.* **2001**, *1*, 12. [[CrossRef](#)]
16. Poynard, T.; Munteanu, M.; Imbert-Bismut, F.; Charlotte, F.; Thabut, D.; Le Calvez, S.; Messous, D.; Thibault, V.; Benhamou, Y.; Moussalli, J.; et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1344–1355. [[CrossRef](#)]
17. Sandrin, L.; Fourquet, B.; Hasquenoph, J.M.; Yon, S.; Fournier, C.; Mal, F.; Christidis, C.; Ziol, M.; Poulet, B.; Kazemi, F.; et al. Transient elastography: A new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med. Biol.* **2003**, *29*, 1705–1713. [[CrossRef](#)]
18. Shaheen, A.A.; Wan, A.F.; Myers, R.P. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: A systematic review of diagnostic test accuracy. *Am. J. Gastroenterol.* **2007**, *102*, 2589–2600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Parkes, J.; Guha, I.N.; Harris, S.; Rosenberg, W.M.; Roderick, P.J. Systematic review of the diagnostic performance of serum markers of liver fibrosis in alcoholic liver disease. *Comp. Hepatol.* **2012**, *11*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Pessoa, M.G.; Ramalho-Madruga, J.V.; Alves, K.; Nunes, E.P.; Cheinquer, H.; Brandão-Mello, C.E.; Mendes-Correa, M.C.; Ferraz, M.L.; Ferreira, P.R.A.; Álvares-da-Silva, M.R.; et al. Efficacy and Safety of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir and Dasabuvir ± Ribavirin for HCV in Brazilian Adults with Advanced Fibrosis. *Ann. Hepatol.* **2018**, *17*, 959–968. [[CrossRef](#)]
21. Badri, P.S.; King, J.R.; Polepally, A.R.; McGovern, B.H.; Dutta, S.; Menon, R.M. Dosing Recommendations for Concomitant Medications During 3D Anti-HCV Therapy. *Clin. Pharmacokinet.* **2016**, *55*, 275–295. [[CrossRef](#)]
22. Poordad, F.; Nelson, D.R.; Feld, J.J.; Fried, M.W.; Wedemeyer, H.; Larsen, L.; Cohen, D.E.; Cohen, E.; Mobashery, N.; Tatsch, F.; et al. Safety of the 2D/3D direct-acting antiviral regimen in HCV-induced Child-Pugh A cirrhosis—A pooled analysis. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 700–707. [[CrossRef](#)]
23. Leung, D.H.; Wirth, S.; Yao, B.B.; Viani, R.M.; Gonzalez-Peralta, R.P.; Jonas, M.M.; Lobritto, S.J.; Narkewicz, M.R.; Sokal, E.; Fortuny, C.; et al. Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir with or Without Dasabuvir and With or Without Ribavirin for Adolescents With HCV Genotype 1 or 4. *Hepatol. Commun.* **2018**, *2*, 1311–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gökcan, H.; Kuzu, U.B.; Öztaş, E.; Saygılı, F.; Öztuna, D.; Suna, N.; Tenlik, İ.; Akdoğan, M.; Kaçar, S.; Kılıç, Z.M.; et al. The predictive value of noninvasive serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Turk. J. Gastroenterol.* **2016**, *27*, 156–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sahin, T.; Serin, A.; Emek, E.; Borkurt, B.; Arıkan, B.T.; Tokat, Y. Effectiveness of Noninvasive Fibrosis Markers for the Prediction of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B and Chronic Hepatitis B+D Induced Cirrhosis. *Transplant. Proc.* **2019**, *51*, 2397–2402. [[CrossRef](#)]
26. Arena, U.; Vizzutti, F.; Abalde, J.G.; Corti, G.; Stasi, C.; Moscarella, S.; Milani, S.; Loreface, E.; Petrarca, A.; Romanelli, R.G.; et al. Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut* **2008**, *57*, 1288–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10.1.2 Praca przeglądowa

Przekop D, Gruszewska E, Chrostek L. Liver function in COVID-19 infection. World Journal of Hepatology, 2021; 13(12): 1909-1918.

Punktacja IF: 3,173; MNiSW: 100

Liver function in COVID-19 infection

Dagmara Przekop, Ewa Gruszewska, Lech Chrostek

ORCID number: Dagmara Przekop 0000-0002-8001-8133; Ewa Gruszewska 0000-0002-7702-5148; Lech Chrostek 0000-0001-6701-1861.

Author contributions: Przekop D, Gruszewska E and Chrostek L wrote the paper, contributing equally to this work.

Conflict-of-interest statement: Authors declare no conflict of interests for this article.

Country/Territory of origin: Poland

Specialty type: Gastroenterology and hepatology

Provenance and peer review: Invited article; Externally peer reviewed.

Peer-review model: Single blind

Peer-review report's scientific quality classification

Grade A (Excellent): 0
Grade B (Very good): B
Grade C (Good): 0
Grade D (Fair): 0
Grade E (Poor): 0

Open-Access: This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to

Dagmara Przekop, Diagnostics-Experimental Center of Sexually Transmissible Diseases, Bialystok 15-879, Poland

Ewa Gruszewska, Lech Chrostek, Department of Biochemical Diagnostics, Medical University of Bialystok, Bialystok 15-269, Poland

Corresponding author: Lech Chrostek, MD, PhD, Full Professor, Department of Biochemical Diagnostics, Medical University of Bialystok, Waszyngtona 15A, Bialystok 15-269, Poland. chrostek@umb.edu.pl

Abstract

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) disease affects multiple organs, including anomalies in liver function. In this review we summarize the knowledge about liver injury found during severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection with special attention paid to possible mechanisms of liver damage and abnormalities in liver function tests allowing for the evaluation of the severity of liver disease. Abnormalities in liver function observed in COVID-19 disease are associated with the age and sex of patients, severity of liver injury, presence of comorbidity and pre-treatment. The method of antiviral treatment can also impact on liver function, which manifests as increasing values in liver function tests. Therefore, analysis of variations in liver function tests is necessary in evaluating the progression of liver injury to severe disease.

Key Words: COVID-19; Pathogenesis of liver injury; Angiotensin-converting enzyme 2 receptor; Liver function tests; Severe COVID-19; Treatment effect

©The Author(s) 2021. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core Tip: The frequency of abnormalities in liver function tests (LFTs) in coronavirus disease 2019 (COVID-19) infected patients increases with age and is observed in males more than females. A pre-existing history of liver disease and comorbidity increases LFT abnormality and the likelihood of severe liver damage in COVID-19 infection. Antiviral treatment and treatment of comorbid diseases intensifies the hepatotoxic effect on the liver, which often manifests itself in higher levels in LFTs.

Citation: Przekop D, Gruszewska E, Chrostek L. Liver function in COVID-19 infection. *World J Hepatol* 2021; 13(12): 1909-1918

distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Received: February 25, 2021

Peer-review started: February 25, 2021

First decision: May 3, 2021

Revised: May 7, 2021

Accepted: November 24, 2021

Article in press: November 24, 2021

Published online: December 27, 2021

P-Reviewer: Lin W

S-Editor: Liu M

L-Editor: A

P-Editor: Liu M



URL: <https://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v13/i12/1909.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.4254/wjh.v13.i12.1909>

INTRODUCTION

Pulmonary disease is the primary clinical manifestation in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) disease. There is increasing evidence of the involvement of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection in multiple organs including the heart, kidneys, central nervous system and liver. In this paper we summarize data concerning liver injury in COVID-19 patients with special attention paid to the possible mechanisms of liver damage and laboratory tests to monitor liver injury during SARS-CoV-2 infection.

GENERAL CHARACTERISTICS

COVID-19 is an acute respiratory infectious disease caused by SARS-CoV-2[1,2]. The SARS-CoV-2 belongs to the *Coronaviridae* family of enveloped, single-stranded RNA viruses[3]. There is evidence that SARS-CoV-2 shares nearly 80% of its genomic sequence with SARS-CoV and about 50% with Middle East respiratory syndrome coronavirus[2,4]. COVID-19 is a viral infectious disease affecting all age groups (from infants to the elderly) resulting in a wide range of clinical manifestations[5-7]. The incubation period of COVID-19 tends to vary from 1 d to 14 d[8].

Multiple organ involvement

Furthermore, COVID-19 infection can present itself with differing degrees of severity, varying from asymptomatic and mild disease to viral pneumonia, in addition to various other extra-pulmonary manifestations, including for example heart, kidney, central nervous system or liver affection, with a risk of fatality[5-7]. Thus, the virus is capable of affecting any organ in the body, and in critically ill patients multiple organs are often affected. Mild cases of COVID-19 infection exhibit symptoms such as fever, dry cough, fatigue, vomiting, diarrhea, muscle weakness, and chest pain[5,7,8]. Patients may also suffer from headaches, as well as loss of smell and taste. While, in severe cases, respiratory distress and/or hypoxemia occur one week after the onset of the disease leading to deterioration into acute respiratory distress syndrome (ARDS), metabolic acidosis, septic shock, and in some cases, even death[5,7,8]. SARS-CoV-2 presents primarily as a lower tract respiratory infection transmitted *via* air droplets, but evidence of the multisystemic nature of COVID-19 is still significantly increasing[5,7,8]. The complications of COVID-19 are associated with several risk factors, namely, advancing age (> 65 years old), cardiovascular disease, hypertension, chronic respiratory disease, diabetes, and obesity[5,8]. The most common reported complication is ARDS, but other severe or even fatal complications are pneumonia, sepsis, metabolic acidosis, heart failure, and acute kidney injury[5,9-11].

Main pulmonary manifestations

Pulmonary affection is the most common serious COVID-19 manifestation[7]. There is evidence that the severity of pulmonary affection caused by SARS-CoV-2 ranges from lack of symptoms or mild pneumonia in 81% of cases, to severe cases associated with hypoxia - in 14% of cases; critical disease associated with shock, respiratory failure and multiple-organ failure - in 5% of cases; or death - in 2.3% of cases[7,12]. SARS-CoV-2 infection induces alveolar damage and interstitial inflammation. During the course of inflammation, the dendritic cells and alveolar macrophages phagocytose epithelial cells infected by SARS-CoV-2, whilst at the same time, the immune mechanisms with T cell responses are activated[7,13].

So, in patients with COVID-19 infection levels of proinflammatory cytokines and chemokines *e.g.*, interleukin 6 (IL-6), IL-1 β , tumor necrosis factor, interferon γ , granulocyte stimulating factor are increased[7,8,14]. There is a suggestion that cytokine storms play a crucial role in the immunopathology of the COVID-19 infection.

Cardiac manifestations

Cardiac injury is a common characteristic of patients with COVID-19 infection. Furthermore, despite the fact that cardiovascular diseases might significantly worsen

the clinical outcome of COVID-19 patients, SARS-CoV-2 infection might also induce new cardiac complications[5,15]. Additionally, this cardiac damage might even occur without of any signs or symptoms of pneumonia and with an absence of other complications[5-7]. The major effects of SARS-CoV-2 infection on cardiomyocytes, include for example, acute myocardial injury, heart failure, impaired renal function, arrhythmias, cardiac arrest, myocarditis, sepsis, and septic shock[5,8,16]. The most frequently presented cardiac complication associated with COVID-19 infection is an acute myocardial injury with an estimated prevalence of 8%-12%[5,6,17]. Additionally, the most prevalent complications, with an estimated incidence of 16.7%, are brady- or tachyarrhythmias, also blood pressure abnormalities and dysfunction of the left ventricular[5,6,18]. Importantly, cardiac complications may occur long after viral clearance and recovery, because the inflammation can persist and evolve silently[6,7]. Confirmation of this thesis is exemplified by pulmonary fibrosis, avascular necrosis or dyslipidemia which have evolved over the long term in many survivors of SARS infection, which is closely related to COVID-19 caused by SARS-CoV-2[6]. There is evidence that about one-half of fatal cases show acute cardiac injury and heart failure [6]. These conditions are more probable in elderly patients, while in younger patients myocarditis is the more likely cause.

Although pulmonary disease is the primary clinical manifestation in patients with COVID-19, with cardiac and kidney injury also being common, as we mentioned above there is increasing evidence of its involvement in multiple organs. In this paper we summarize data concerning liver injury in COVID-19 patients.

POSSIBLE PATHOMECHANISMS OF LIVER INJURY

The alteration of hepatocyte damage biomarkers, such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, and bilirubin is a common laboratory finding in patients with COVID-19 infection. However, the pathomechanism of liver injury during infection is convoluted and not yet fully understood[8,19]. Is not clear if the liver damage is caused by the direct viral effect or if it perhaps reflects a more severe inflammatory response with hepatic injury[20,21]. The possible major pathomechanisms of liver damage are presented in Figure 1. It has been reported that the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) was identified as the SARS-CoV binding site[19,20,22]. This data facilitated confirmation that SARS-CoV-2 may also directly enter the host cells through binding of its S protein to ACE2 on the surface of the host cell, although with a 10-20-fold higher affinity[2]. The ACE2 receptor expression is higher in many organs, such as lungs, heart, kidney, and it is widely expressed across a variety of cell types[8,22]. Hepatocytes and bile duct epithelial cells also express the ACE2 receptor[7,8,19]. Nevertheless, no significant altered histopathological features have been detected in such cells from COVID-19 patients[8,23]. Only single studies have claimed that the derangement of liver function is usually mild and there is not enough evidence that late-onset symptoms are related to increasing liver damage in patients with COVID-19 infection[2,19]. Additionally, recent data has suggested that SARS-CoV-2 may directly bind to ACE2 expressed in cholangiocytes, because there is evidence that ACE2 expression is displayed in 2.6% of hepatocytes and 59.7% of cholangiocytes[2,19]. Moreover, the alteration of cholangiocyte injury biomarkers, such as alkaline phosphatase (ALP) and γ -glutamyl transferase (GGT) has been observed in some cases, and consistent with biliary epithelial cell damage, and about 10% of patients with COVID-19 infection have an elevated total level of bilirubin[2,24]. There is evidence that specific expression of ACE2 in bile duct epithelial cells was about 20 times higher than in hepatocyte. Furthermore, the bile duct epithelial cells play a substantial role in immune response and liver regeneration. So, this data suggests that liver damage in COVID-19 infection results from bile duct cell injury rather than a direct viral effect in liver cells[19].

On the other hand, the liver is a vital organ for the metabolism of drugs. It is well known that patients suffering from certain viral infections caused for example, by the human immunodeficiency virus or hepatitis C virus are more prone to develop drug-induced liver injury, particularly when it is associated with highly active antiretroviral therapy[25-27]. Therefore, nowadays it is postulated that the same mechanism of liver injury could be present in COVID-19 as a result of the SARS-CoV-2 virus. Thus, hepatotoxicity during the course of the COVID-19 infection, may be initiated by the different types of antiviral drugs, antibiotics and steroids which are currently used to treat COVID-19 patients[25,28]. However, there is a lack of evidence for liver damage in chronic COVID-19 patients being completely drug-induced. A

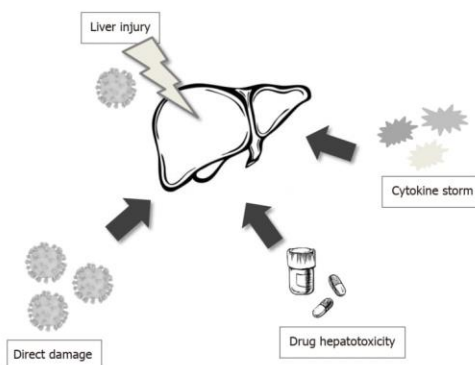


Figure 1 Possible pathomechanism of liver injury in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection.

potential example of the relationship between the use of certain drugs and resulting liver damage is found in the study of Fan *et al*[29]. They reported that a high percentage of patients with abnormal values in liver function tests (LFTs) were treated with lopinavir and ritonavir during hospitalization. Similar results appeared in the study of Cai *et al*[30]. Moreover, they reported an almost four-fold increase in liver injury after lopinavir/ritonavir were used in the treatment of severe COVID-19 infection. This finding is consistent with some liver biopsy findings[31]. Certain studies have reported mild lobular and portal activity and moderate microvascular steatosis in patients who died from COVID-19[23]. Further evidence also showed minimal lymphocytic infiltration and mild sinusoidal dilatation in COVID-19 patients [24]. However, these alterations are nonspecific and may be caused by drug-induced liver injury, not excluding the possibility of hypoxemia or having come directly from the SARS-CoV-2 virus[19,23]. Considering these facts, it is very important that these patients be treated with drugs that can inhibit inflammatory response while at the same time protecting hepatic functions.

Another possible reason for liver damage in patients with COVID-19 infection may be dysregulation of the innate immune response[2,19,22]. There is evidence that inflammatory cytokine storms were found in chronically ill patients. The increased values of inflammatory indices, such as C-reactive protein (CRP), IL-6, neutrophils and lymphocytes can be observed in patients with COVID-19 infection, which suggests a relationship between liver damage and inflammatory response induced by severe COVID-19 infection.

ABNORMALITIES IN LABORATORY TESTS

There are many studies showing abnormal laboratory test results in patients with severe COVID-19 disease[32-35]. The first cases of COVID-19 patients from China with liver abnormality were documented by Chen *et al*[32]. Elevations in ALT, AST and lactate dehydrogenase (LDH) were present in 43 out of 99 patients, while most of these cases showed some mild abnormality, whilst one patient exhibited a large increase in test results (ALT of 7590 U/L and AST of 1445 U/L). Most of the participants were male, half of them with chronic diseases. LFTs not only showed abnormalities such as aminotransferases, but also noted were decreased haemoglobin, platelets, an increase of creatine kinase, LDH, ferritin, CRP and a decrease/increase in leucocytes[32].

Cai *et al*[30] conducted laboratory tests on a population of 417 patients with COVID-19 in Shenzhen hospital, China. Three hundred and eighteen patients were confirmed with abnormal liver test results, whilst another 90 had liver injury during hospitalization. The patients were qualified to the appropriate types. Abnormalities such as: hepatocellular type [elevated ALT and/or AST more than $3 \times$ the upper limit unit of normal (ULN)], cholangiocyte type (raised ALP or GGT $2 \times$ ULN) or mixed type (elevated ALT and/or AST more than $3 \times$ the upper limit ULN and raised ALP or GGT

2 × ULN). The highest increase (3 × ULN) in liver enzymes such as ALT (23.4 % of patients), AST (14.8%), total bilirubin (TBIL) (11.5%) and GGT (24.4%) was noticed during the second week of hospitalization. Out of 318 cases, the mixed type dominated and there was a noted increase in all the above tests, except for ALP. In relation to the population of 90 patients, an increase was seen in ALT and GGT, while AST and TBIL were hardly visible. Mixed type patients or those with abnormal test results are at a greater risk of advanced to severe disease. Patients treated with lopinavir/ritonavir had much higher levels of TBIL and GGT, with an associated four-fold increase in the risk of liver damage[30].

A Study carried out on 292 patients in Italy led researchers to different conclusions than Cai *et al*[30]. In their opinion, LFTs are not associated with the patient's condition deteriorating to a severe form of pneumonia. Elevations in AST (18.5%), ALT (26.7%), GGT (36.2%), TBIL (10.6%) and ALP (9.2%) were inconsiderable[36]. Only ALP was not ruled out as a predictive factor, however, it may be associated with bad patient condition, systemic inflammatory response or SARS-CoV-2 tropism for the liver and ACE2 converting enzyme expression in cholangiocytes and hepatocytes. Although 250 patients were treated with lopinavir/ritonavir and 56 patients died, 82 deteriorated and 56 were admitted to intensive care, this was not in any way related to LFTs. Researchers recommended drawing conclusions carefully in the context of a complex multi-organ disease[36].

Wang *et al*[37] conducted an experiment on 156 people diagnosed with the SARS-CoV-2 virus from 2 chosen centers in China, in which they tested the correlation between the prognosis of patients and liver enzyme abnormalities, or lack of such abnormalities. Sixty-four of them had elevated AST and ALT which correlated with disease severity, higher alveolar-arterial oxygen partial pressure difference, growth of GGT, lower albumin and CD4+ T cells and B lymphocytes. The histological trial revealed severe liver apoptosis. Cytopathy in hepatocytes showed ultrastructural features such as endoplasmic reticulum dilatation, mitochondrial swelling and an impaired cell membrane. The above evidence shows that the virus has an influence on the increase in the value of liver enzymes. The most important observation was an association between a very high level of alveolar-arterial oxygen tension difference (A-ADO2) and elevated transaminases. According to this study, SARS-CoV-2 virus infection is a direct factor in liver disease[37].

Conclusions from a study carried out on 5771 adult patients from 10 hospitals in Wuhan indicated a need for monitoring hepatic parameters during hospitalization [38]. On admission to the hospital, chronically ill patients had AST levels significantly higher than ALT. Abnormalities in LFTs have been additionally associated with males, treatment, chronic liver disease, lymphocyte, neutrophil and platelet count. Abnormalities in LFTs, such as AST, ALT, TBIL, GGT, were related to mortality, however AST had the highest correlation. A significantly higher level of AST compared to ALT was also confirmed in the study of Guan *et al*[39] and Chu *et al*[40].

The medical records of 838 patients hospitalized in China indicated an increased level of AST and GGT[40]. Anomalies in LFTs (AST, GGT) were associated with organ injuries, hypoxia, inflammation and the use of antiviral drugs. The level of AST, ALT, GGT and total bilirubin displayed no significant difference between patients who were treated or not treated with umifenovir. By way of contrast, patients who underwent lopinavir/ritonavir treatment had higher levels of AST and GGT. Among the total number of COVID-19 patients, 48.8% showed normal liver function and 51.2% liver injury. Fan *et al*[29] observed abnormal liver function defined as increased LFTs in 57.8% of SARS-CoV-2 patients treated with lopinavir/ritonavir. Moreover, research in Italy suggested that remdesivir may be significant in the origin of hepatocellular injury [41]. Four out of five patients who switched from lopinavir/ritonavir to remdesivir had a reduced level of bilirubin, and significantly increased levels of AST and ALT.

In a study of 2115 people conducted in China, a more notable level of liver injury was uncovered in the group treated with lopinavir/ritonavir than in the untreated group[42]. Patients with COVID-19 and with pre-existing liver injury had more severe disease and a higher prevalence of mortality. However, the observed changes did not mimic the so-called 'cytokine storm' because the absolute lymphocyte count was lower and ESR was higher in the liver injury group than that of the non-liver injury group.

Hundt *et al*[43] observed abnormal liver tests at admission (AST 66.9%, ALT 41.6%, ALP 13.5%, and TBIL 4.3%) and peak of hospitalization (AST 83.4%, ALT 61.6%, ALP 22.7%, and TBIL 16.1%). Moreover, the type of treatment used (hydroxychloroquine, lopinavir/ritonavir, remdesivir, tocilizumab) was associated with abnormal liver transaminase elevations during hospitalization. The results of liver tests were associated with intensive care unit (ICU) admission, mechanical ventilation and death, as well as age, sex and comorbidities. Patients with severe COVID-19 showed an

increase in the total of bilirubin and regardless of severity, a significant rise in transaminases and decrease in albumin was observed[43]. Studies conducted on the Indian population also confirmed the link between laboratory test abnormalities and the severity of the disease[44]. Kumar *et al*[44] included 91 patients in their study, excluding those with pre-existing liver disease (hepatitis B and C, alcoholics, those on known hepatotoxic treatment). The analysis of patients divided into groups (I. asymptomatic, II. mild, III. moderate, IV. severe) showed that the level of transaminases was highest in group IV, ALP was highest in group III but for total bilirubin growth there was no difference between the groups. This study showed that AST and ALP are better tests for indicating the severity of liver damage in COVID-19 than ALT and TBIL.

LFT abnormality was confirmed in 17.6% of Chinese patients with the COVID-19 infection (a population of 159 patients)[45]. The authors concluded that frequency of LFT abnormality was greater in patients with chronic disease than those with mild/moderate illness, especially in older patients. In the another study (148 cases) abnormal liver function was noted in 37.2% of patients on admission and nearly half of those were over 50 years old, half of the 37.2% being men[44]. The patients with abnormal liver function had higher inflammatory indexes (CRP and procalcitonin). On admission, patients who received lopinavir/ritonavir treatment displayed a higher frequency of abnormal LFTs than those with normal liver function. The effect of antiviral treatment on liver function was observed in the study of Zampino *et al*[41]. Treatment of COVID-19 patients with remdesivir can cause hepatocellular injury with aminotransferase elevation, in contrast to the trend of bilirubin elevation with lopinavir/ritonavir treatment.

Abnormally raised liver enzymes were seen in about half of patients with COVID-19 disease[46]. AST and/or ALT $> 3 \times$ ULN, and/or ALP and/or GGT $> 2 \times$ ULN was seen in 53.5% of patients with hepatocellular injury. In addition, an association between LFTs and markers of inflammation (CRP and ferritin) was observed. Total protein and albumin, were significantly reduced in patients with abnormal liver enzymes and in patients with liver injury, in contrast to the total bilirubin level, which was significantly increased in these patients. Hepatocellular and cholestatic liver injury was more frequent in patients below the age of 50, whereas in patients over 50 years old, more common was the mixed type of liver injury.

Among a French cohort of 281 patients, 102 of them had increased liver enzymes (36.3%)[47]. The most common was an increase in GGT, followed by AST and ALT. Cases with elevated LFTs and CRP value were associated with higher rates of admission to ICU and mortality. Age, sex, diabetes and hypertension were not associated with disease severity. High levels of ALT or AST are associated with disease severity. The authors suggested that liver abnormalities are due to sepsis and tissue hypoxemia, which is documented by apoptotic injuries visualized in the histological examination (vesicular steatosis and watery degeneration). In summary, liver test abnormalities are associated with a poorer prognosis in patients with the coronavirus disease 2019[47].

A study conducted in Istanbul confirmed that liver test abnormalities, especially the AST/ALT ratio, was a good marker of mortality risk and the need for ICU admission [48]. A poorer prognosis rate was associated with higher levels of AST and ALT in the mixed pattern group followed by the hepatocellular injury group and the cholestatic injury group. Mortality in patients with abnormal AST and ALT was higher than that of patients with normal results. The patients with increased AST and ALT showed elevated levels of CRP, procalcitonin, ferritin, D-dimer, lactate and TBIL, which ultimately extended the hospitalization period[48]. The percentage of people in the ICU with elevated aminotransferases was higher than those with normal test results. Patients with ratio AST/ALT > 1 had a higher level of CRP, fibrinogen, LDH, APTT, d-dimer and lower levels of lymphocyte, albumin and GGT. This study showed that low albumin may be marker of severity in SARS-CoV-2 during the hospital admission. Abnormalities in LFTs are more common in men compared to women.

Comorbidities in people with liver diseases are a huge problem, which may have an impact on the severity of COVID-19. A prime example is obesity, in which a person is more prone to develop non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD)[49]. In adipose tissue, there may be a greater expression of ACE2, which increases the risk of severe COVID-19. Chronic liver disease also affects the severity of the disease. This may be related to low levels of blood platelets and lymphocytes[50]. A higher index of cytokines has also been reported, which may influence the progression of NAFLD[51]. In the course of liver cirrhosis, attention should be paid to the activation of cytokines, which leads to hepatocyte necrosis. A study population, from 9 hospitals in Lombardy showed higher mortality (17 out of 50 respondents died)[52]. There was a decrease in

albumin in patients and a significant increase in bilirubin, creatinine and prothrombin. Zou *et al*[53] detected elevated LFTs in 105 Wuhan patients with chronic HBV infection and coexisting SARS-CoV-2 (ALT 20.95%, AST 27.62%, TBIL and GGT 6.67%). These values changed during hospitalization, where 28.57% of the subjects developed acute or chronic liver failure[53]. Research carried out on 9 pregnant women showed lymphopenia ($< 10 \times 10^9$ cells per L) in 5 of them, elevated CRP (> 10 mg/L) in 6 and 3 had raised AST and ALT[54]. One patient demonstrated a very high level of AST (1263 U/L) and ALT (2093 U/L).

Liver injury in severe COVID-19

The liver test abnormalities mentioned above are more frequently found in severe COVID-19 infection than in mild courses of the same infection. A few studies have demonstrated a relationship between liver test abnormalities, disease severity and mortality of patients with COVID-19[30,55]. A higher rate of LFT abnormalities was observed in severe COVID-19 infection. The higher liver test markers such as ALT, AST, GGT and total bilirubin were reported more in severe patients than in non-severe ones[56,57]. A large cohort study totalling 1099 patients, reported a much higher level of ALT and AST in severe patients (28% and 39%, respectively) than in non-severe patients (20% and 18%, respectively)[39]. So-called weighted mean difference for AST, ALT, total bilirubin and for albumin were associated with a significant increase in the severity of COVID-19 infection[58]. Among the 3381 patients included in the retrospective cohort study, 67.2% of them who were positive for SARS-CoV-2 had higher initial and peak of ALT than those who were negative[59]. Additionally, severe acute liver injury was significantly associated with elevated inflammatory markers including ferritin and IL-6. Besides ferritin and IL-6, other tests such as WBC count, lymphocyte count and platelet count were strong discriminators for severe disease[60].

There is a discrepancy between the frequency of liver test abnormalities and the liver injury in COVID-19 patients. For example, elevated liver damage markers were present in 76.3% of hospitalised patients but only 21.5% of them had liver injury[30]. This variance can be explained by pre-existing liver diseases, which contributed to the severity of liver injury during COVID-19 infection[61,62]. Finally, patients with severe liver injury are more likely to have a poorer prognosis[21]. On the other hand, pre-existing liver disease can increase the risk of COVID-19 infection[63].

CONCLUSION

Not all COVID-19 patients have liver injury and abnormalities in LFTs. However, after measuring the wide variations in these tests, the clinicians can come to some conclusions about the severity of the liver disease and improve the prognosis for patients with liver damage.

REFERENCES

- 1 **Bogoch II**, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K. Potential for global spread of a novel coronavirus from China. *J Travel Med* 2020; **27** [PMID: 31985790 DOI: 10.1093/jtm/taaa011]
- 2 **Tian D**, Ye Q. Hepatic complications of COVID-19 and its treatment. *J Med Virol* 2020; **92**: 1818-1824 [PMID: 32437004 DOI: 10.1002/jmv.26036]
- 3 **Cui J**, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019; **17**: 181-192 [PMID: 30531947 DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9]
- 4 **Zhu N**, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; **382**: 727-733 [PMID: 31978945 DOI: 10.1056/NEJMoa2001017]
- 5 **Baj J**, Karakula-Juchnowicz H, Teresiński G, Buszewicz G, Ciesielka M, Sitarz E, Forma A, Karakula K, Flieger W, Portincasa P, Maciejewski R. COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge. *J Clin Med* 2020; **9** [PMID: 32516940 DOI: 10.3390/jcm9061753]
- 6 **Jain U**. Effect of COVID-19 on the Organs. *Cureus* 2020; **12**: e9540 [PMID: 32905500 DOI: 10.7759/cureus.9540]
- 7 **Gavriatopoulou M**, Korompoki E, Fotiou D, Ntanasios-Stathopoulos I, Psaltopoulou T, Kastritis E, Terpos E, Dimopoulos MA. Organ-specific manifestations of COVID-19 infection. *Clin Exp Med* 2020; **20**: 493-506 [PMID: 32720223 DOI: 10.1007/s10238-020-00648-x]

- 8 **Ciaccio M**, Agnello L. Biochemical biomarkers alterations in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Diagnosis (Berl)* 2020; **7**: 365-372 [PMID: 32589600 DOI: 10.1515/dx-2020-0057]
- 9 **Chellasamy G**, Arumugasamy SK, Govindaraju S, Yun K. Analytical insights of COVID-19 pandemic. *Trends Analyt Chem* 2020; **133**: 116072 [PMID: 33100439 DOI: 10.1016/j.trac.2020.116072]
- 10 **Fu L**, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, Li P, Zhou Y, Lin YF, Duan Q, Luo G, Fan S, Lu Y, Feng A, Zhan Y, Liang B, Cai W, Zhang L, Du X, Li L, Shu Y, Zou H. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2020; **80**: 656-665 [PMID: 32283155 DOI: 10.1016/j.jinf.2020.03.041]
- 11 **Chen T**, Wu D, Chen H, Yan W, Yang D, Chen G, Ma K, Xu D, Yu H, Wang H, Wang T, Guo W, Chen J, Ding C, Zhang X, Huang J, Han M, Li S, Luo X, Zhao J, Ning Q. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ* 2020; **368**: m1091 [PMID: 32217556 DOI: 10.1136/bmj.m1091]
- 12 **Wu Z**, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020; **323**: 1239-1242 [PMID: 32091533 DOI: 10.1001/jama.2020.2648]
- 13 **Channappanavar R**, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res* 2014; **59**: 118-128 [PMID: 24845462 DOI: 10.1007/s12026-014-8534-z]
- 14 **Huang SH**. What We Know So Far (As of March 26, 2020) About COVID-19-An MRT Point of View. *J Med Imaging Radiat Sci* 2020; **51**: 200-203 [PMID: 32279977 DOI: 10.1016/j.jmir.2020.03.004]
- 15 **Bansal M**. Cardiovascular disease and COVID-19. *Diabetes Metab Syndr* 2020; **14**: 247-250 [PMID: 32247212 DOI: 10.1016/j.dsx.2020.03.013]
- 16 **Lippi G**, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F. Cardiac troponin I in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis* 2020; **63**: 390-391 [PMID: 32169400 DOI: 10.1016/j.pcad.2020.03.001]
- 17 **Kang Y**, Chen T, Mui D, Ferrari V, Jagasia D, Scherrer-Crosbie M, Chen Y, Han Y. Cardiovascular manifestations and treatment considerations in COVID-19. *Heart* 2020; **106**: 1132-1141 [PMID: 32354800 DOI: 10.1136/heartjnl-2020-317056]
- 18 **Madjid M**, Safavi-Naeini P, Solomon SD, Vardeny O. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review. *JAMA Cardiol* 2020; **5**: 831-840 [PMID: 32219363 DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1286]
- 19 **Ali N**, Hossain K. Liver injury in severe COVID-19 infection: current insights and challenges. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2020; **14**: 879-884 [PMID: 32649840 DOI: 10.1080/17474124.2020.1794812]
- 20 **Garrido I**, Liberal R, Macedo G. Review article: COVID-19 and liver disease-what we know on 1st May 2020. *Aliment Pharmacol Ther* 2020; **52**: 267-275 [PMID: 32402090 DOI: 10.1111/apt.15813]
- 21 **Feng G**, Zheng KI, Yan QQ, Rios RS, Targher G, Byrne CD, Poucke SV, Liu WY, Zheng MH. COVID-19 and Liver Dysfunction: Current Insights and Emergent Therapeutic Strategies. *J Clin Transl Hepatol* 2020; **8**: 18-24 [PMID: 32274342 DOI: 10.14218/JCTH.2020.00018]
- 22 **Alqahtani SA**, Schattenberg JM. Liver injury in COVID-19: The current evidence. *United European Gastroenterol J* 2020; **8**: 509-519 [PMID: 32450787 DOI: 10.1177/2050640620924157]
- 23 **Xu Z**, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, Liu S, Zhao P, Liu H, Zhu L, Tai Y, Bai C, Gao T, Song J, Xia P, Dong J, Zhao J, Wang FS. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 2020; **8**: 420-422 [PMID: 32085846 DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X]
- 24 **Zhang Y**, Zheng L, Liu L, Zhao M, Xiao J, Zhao Q. Liver impairment in COVID-19 patients: A retrospective analysis of 115 cases from a single centre in Wuhan city, China. *Liver Int* 2020; **40**: 2095-2103 [PMID: 32239796 DOI: 10.1111/liv.14455]
- 25 **Boeckmans J**, Rodrigues RM, Demuyser T, Piérard D, Vanhaecke T, Rogiers V. COVID-19 and drug-induced liver injury: a problem of plenty or a petty point? *Arch Toxicol* 2020; **94**: 1367-1369 [PMID: 32266419 DOI: 10.1007/s00204-020-02734-1]
- 26 **Naidoo K**, Hassan-Moosa R, Mlotshwa P, Yende-Zuma N, Govender D, Padayatchi N, Abdool-Karim SSS. High Rates of Drug-induced Liver Injury in People Living With HIV Coinfected With Tuberculosis (TB) Irrespective of Antiretroviral Therapy Timing During Antituberculosis Treatment: Results From the Starting Antiretroviral Therapy at Three Points in TB Trial. *Clin Infect Dis* 2020; **70**: 2675-2682 [PMID: 31622456 DOI: 10.1093/cid/ciz732]
- 27 **Bonacini M**. Liver injury during highly active antiretroviral therapy: the effect of hepatitis C coinfection. *Clin Infect Dis* 2004; **38** Suppl 2: S104-S108 [PMID: 14986282 DOI: 10.1086/381453]
- 28 **Zhang C**, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; **5**: 428-430 [PMID: 32145190 DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30057-1]
- 29 **Fan Z**, Chen L, Li J, Cheng X, Yang J, Tian C, Zhang Y, Huang S, Liu Z, Cheng J. Clinical Features of COVID-19-Related Liver Functional Abnormality. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020; **18**: 1561-1566 [PMID: 32283325 DOI: 10.1016/j.cgh.2020.04.002]
- 30 **Cai Q**, Huang D, Yu H, Zhu Z, Xia Z, Su Y, Li Z, Zhou G, Gou J, Qu J, Sun Y, Liu Y, He Q, Chen J, Liu L, Xu L. COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol* 2020; **73**: 566-574 [PMID: 32298767 DOI: 10.1016/j.jhep.2020.04.006]
- 31 **Luglio M**, Tannuri U, de Carvalho WB, Bastos KLM, Rodriguez IS, Johnston C, Delgado AF.

- COVID-19 and Liver Damage: Narrative Review and Proposed Clinical Protocol for Critically ill Pediatric Patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2020; **75**: e2250 [PMID: 33206767 DOI: 10.6061/clinics/2020e2250]
- 32 **Chen N**, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020; **395**: 507-513 [PMID: 32007143 DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7]
 - 33 **Yang W**, Cao Q, Qin L, Wang X, Cheng Z, Pan A, Dai J, Sun Q, Zhao F, Qu J, Yan F. Clinical characteristics and imaging manifestations of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): A multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. *J Infect* 2020; **80**: 388-393 [PMID: 32112884 DOI: 10.1016/j.jinf.2020.02.016]
 - 34 **Zhang JJ**, Dong X, Cao YY, Yuan YD, Yang YB, Yan YQ, Akdis CA, Gao YD. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy* 2020; **75**: 1730-1741 [PMID: 32077115 DOI: 10.1111/all.14238]
 - 35 **Wang D**, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020; **323**: 1061-1069 [PMID: 32031570 DOI: 10.1001/jama.2020.1585]
 - 36 **Vespa E**, Pugliese N, Piovani D, Capogreco A, Danese S, Aghemo A; Humanitas Covid-19 Task Force. Liver tests abnormalities in COVID-19: trick or treat? *J Hepatol* 2020; **73**: 1275-1276 [PMID: 32473194 DOI: 10.1016/j.jhep.2020.05.033]
 - 37 **Wang Y**, Liu S, Liu H, Li W, Lin F, Jiang L, Li X, Xu P, Zhang L, Zhao L, Cao Y, Kang J, Yang J, Li L, Liu X, Li Y, Nie R, Mu J, Lu F, Zhao S, Lu J, Zhao J. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol* 2020; **73**: 807-816 [PMID: 32437830 DOI: 10.1016/j.jhep.2020.05.002]
 - 38 **Lei F**, Liu YM, Zhou F, Qin JJ, Zhang P, Zhu L, Zhang XJ, Cai J, Lin L, Ouyang S, Wang X, Yang C, Cheng X, Liu W, Li H, Xie J, Wu B, Luo H, Xiao F, Chen J, Tao L, Cheng G, She ZG, Zhou J, Wang H, Lin J, Luo P, Fu S, Ye P, Xiao B, Mao W, Liu L, Yan Y, Chen G, Huang X, Zhang BH, Yuan Y. Longitudinal Association Between Markers of Liver Injury and Mortality in COVID-19 in China. *Hepatology* 2020; **72**: 389-398 [PMID: 32359177 DOI: 10.1002/hep.31301]
 - 39 **Guan WJ**, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; **382**: 1708-1720 [PMID: 32109013 DOI: 10.1056/NEJMoa2002032]
 - 40 **Chu H**, Bai T, Chen L, Hu L, Xiao L, Yao L, Zhu R, Niu X, Li Z, Zhang L, Han C, Song S, He Q, Zhao Y, Zhu Q, Chen H, Schnabl B, Yang L, Hou X. Multicenter Analysis of Liver Injury Patterns and Mortality in COVID-19. *Front Med (Lausanne)* 2020; **7**: 584342 [PMID: 33195339 DOI: 10.3389/fmed.2020.584342]
 - 41 **Zampino R**, Mele F, Florio LL, Bertolino L, Andini R, Galdo M, De Rosa R, Corcione A, Durante-Mangoni E. Liver injury in remdesivir-treated COVID-19 patients. *Hepatol Int* 2020; **14**: 881-883 [PMID: 32725454 DOI: 10.1007/s12072-020-10077-3]
 - 42 **Yadav DK**, Singh A, Zhang Q, Bai X, Zhang W, Yadav RK, Zhiwei L, Adhikari VP, Liang T. Involvement of liver in COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Gut* 2021; **70**: 807-809 [PMID: 32669289 DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322072]
 - 43 **Hundt MA**, Deng Y, Ciarleglio MM, Nathanson MH, Lim JK. Abnormal Liver Tests in COVID-19: A Retrospective Observational Cohort Study of 1,827 Patients in a Major U.S. Hospital Network. *Hepatology* 2020; **72**: 1169-1176 [PMID: 32725890 DOI: 10.1002/hep.31487]
 - 44 **Kumar A**, Kumar P, Dungdung A, Kumar Gupta A, Anurag A, Kumar A. Pattern of liver function and clinical profile in COVID-19: A cross-sectional study of 91 patients. *Diabetes Metab Syndr* 2020; **14**: 1951-1954 [PMID: 33039937 DOI: 10.1016/j.dsx.2020.10.001]
 - 45 **Li S**, Li J, Zhang Z, Tan L, Shao T, Li M, Li X, Holmes JA, Lin W, Han M. COVID-19 induced liver function abnormality associates with age. *Aging (Albany NY)* 2020; **12**: 13895-13904 [PMID: 32721928 DOI: 10.18632/aging.103720]
 - 46 **Saini RK**, Saini N, Ram S, Soni SL, Suri V, Malhotra P, Kaur J, Verma I, Sharma S, Zohmangaihi D. COVID-19 associated variations in liver function parameters: a retrospective study. *Postgrad Med J* 2020 epub ahead of print [PMID: 33184141 DOI: 10.1136/postgradmedj-2020-138930]
 - 47 **Chaibi S**, Boussier J, Hajj WE, Abitbol Y, Taieb S, Horaist C, Jouannaud V, Wang P, Piquet J, Maurer C, Lahmek P, Nahon S. Liver function test abnormalities are associated with a poorer prognosis in Covid-19 patients: Results of a French cohort. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2021; **45**: 101556 [PMID: 33139241 DOI: 10.1016/j.clinre.2020.10.002]
 - 48 **Medetaliboyoglu A**, Catma Y, Senkal N, Ormeeci A, Cavus B, Kose M, Bayramlar OF, Yildiz G, Akyuz F, Kaymakoglu S, Tukek T. The effect of liver test abnormalities on the prognosis of COVID-19. *Ann Hepatol* 2020; **19**: 614-621 [PMID: 32920162 DOI: 10.1016/j.aohp.2020.08.068]
 - 49 **Zheng KI**, Gao F, Wang XB, Sun QF, Pan KH, Wang TY, Ma HL, Chen YP, Liu WY, George J, Zheng MH. Letter to the Editor: Obesity as a risk factor for greater severity of COVID-19 in patients with metabolic associated fatty liver disease. *Metabolism* 2020; **108**: 154244 [PMID: 32320741 DOI: 10.1016/j.metabol.2020.154244]

- 50 **Qi X**, Liu Y, Wang J, Fallowfield JA, Li X, Shi J, Pan H, Zou S, Zhang H, Chen Z, Li F, Luo Y, Mei M, Liu H, Wang Z, Li J, Yang H, Xiang H, Liu T, Zheng MH, Liu C, Huang Y, Xu D, Kang N, He Q, Gu Y, Zhang G, Shao C, Liu D, Zhang L, Kawada N, Jiang Z, Wang F, Xiong B, Takehara T, Rockey DC; COVID-Cirrhosis-CHESS Group. Clinical course and risk factors for mortality of COVID-19 patients with pre-existing cirrhosis: a multicentre cohort study. *Gut* 2021; **70**: 433-436 [PMID: 32434831 DOI: 10.1136/gutjnl-2020-321666]
- 51 **Prins GH**, Olinga P. Potential implications of COVID-19 in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2020; **40**: 2568 [PMID: 32306495 DOI: 10.1111/Liv.14484]
- 52 **Iavarone M**, D'Ambrosio R, Soria A, Triolo M, Pugliese N, Del Poggio P, Perricone G, Massironi S, Spinetti A, Buscarini E, Viganò M, Carriero C, Fagioli S, Aghemo A, Belli LS, Lucà M, Pedaci M, Rimondi A, Rumi MG, Invernizzi P, Bonfanti P, Lampertico P. High rates of 30-day mortality in patients with cirrhosis and COVID-19. *J Hepatol* 2020; **73**: 1063-1071 [PMID: 32526252 DOI: 10.1016/j.jhep.2020.06.001]
- 53 **Zou X**, Fang M, Li S, Wu L, Gao B, Gao H, Ran X, Bian Y, Li R, Shanshan Yu, Ling J, Li D, Tian D, Huang J. Characteristics of Liver Function in Patients With SARS-CoV-2 and Chronic HBV Coinfection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2021; **19**: 597-603 [PMID: 32553907 DOI: 10.1016/j.cgh.2020.06.017]
- 54 **Chen H**, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, Li J, Zhao D, Xu D, Gong Q, Liao J, Yang H, Hou W, Zhang Y. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet* 2020; **395**: 809-815 [PMID: 32151335 DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30360-3]
- 55 **Bloom PP**, Meyerowitz EA, Reimus Z, Daidone M, Gustafson J, Kim AY, Schaefer E, Chung RT. Liver Biochemistries in Hospitalized Patients With COVID-19. *Hepatology* 2021; **73**: 890-900 [PMID: 32415860 DOI: 10.1002/hep.31326]
- 56 **Huang C**, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; **395**: 497-506 [PMID: 31986264 DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5]
- 57 **Richardson S**, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW; the Northwell COVID-19 Research Consortium, Barnaby DP, Becker LB, Chelico JD, Cohen SL, Cookingham J, Coppa K, Diefenbach MA, Dominello AJ, Duer-Hefele J, Falzon L, Gitlin J, Hajizadeh N, Harvin TG, Hirschwerk DA, Kim EJ, Kozel ZM, Marrast LM, Mogaero JN, Osorio GA, Qiu M, Zanos TP. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* 2020; **323**: 2052-2059 [PMID: 32320003 DOI: 10.1001/jama.2020.6775]
- 58 **Parohan M**, Yaghoubi S, Seraji A. Liver injury is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection: A systematic review and meta-analysis of retrospective studies. *Hepatol Res* 2020; **50**: 924-935 [PMID: 32386449 DOI: 10.1111/hepr.13510]
- 59 **Phipps MM**, Barraza LH, LaSota ED, Sobieszczyk ME, Pereira MR, Zheng EX, Fox AN, Zucker J, Verna EC. Acute Liver Injury in COVID-19: Prevalence and Association with Clinical Outcomes in a Large U.S. Cohort. *Hepatology* 2020; **72**: 807-817 [PMID: 32473607 DOI: 10.1002/hep.31404]
- 60 **Henry BM**, de Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2020; **58**: 1021-1028 [PMID: 32286245 DOI: 10.1515/cclm-2020-0369]
- 61 **Singh S**, Khan A. Clinical Characteristics and Outcomes of Coronavirus Disease 2019 Among Patients With Preexisting Liver Disease in the United States: A Multicenter Research Network Study. *Gastroenterology* 2020; **159**: 768-771.e3 [PMID: 32376408 DOI: 10.1053/j.gastro.2020.04.064]
- 62 **Moon AM**, Webb GJ, Aloman C, Armstrong MJ, Cargill T, Dhanasekaran R, Genesca J, Gill US, James TW, Jones PD, Marshall A, Mells G, Perumalswami PV, Qi X, Su F, Ufere NN, Barnes E, Barritt AS, Marjot T. High mortality rates for SARS-CoV-2 infection in patients with pre-existing chronic liver disease and cirrhosis: Preliminary results from an international registry. *J Hepatol* 2020; **73**: 705-708 [PMID: 32446714 DOI: 10.1016/j.jhep.2020.05.013]
- 63 **Liang W**, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K, Li C, Ai Q, Lu W, Liang H, Li S, He J. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *Lancet Oncol* 2020; **21**: 335-337 [PMID: 32066541 DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30096-6]

11. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

**KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1

15-089 Białystok

tel. 85 748 54 07

komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 28.04.2022 r.

Uchwała nr: APK.002.481.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Nieinwazyjna diagnostyka chorób wątroby” przez prof. dr hab. Lecha Chrostka wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 28.04.2022 r. do 31.06.2022 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Powinno

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca:

2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

Wiśniadczą się, że Pani mgr Dagmara Prekop jest członkiem zespołu badawczego w powyższym projekcie badawczym.

UNIwersYTET MEDYCZNY
w Białymstoku
KOMISJA BIOETYCZNA
15-089 Białystok, ul. Jana Kilińskiego 1

12. OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oryginał oświadczenia autora wchodzący w skład rozprawy doktorskiej znajduje się w przedmiotowej dokumentacji w Dziekanacie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim w Białymstoku.

Mgr Dagmara Przekop
imię i nazwisko współautora

Białystok, 2022-03-17
miejscowość, data

Ośrodek Diagnostyczno-Badawczy
Chorób Przenoszonych Drogą Płciową
Białystok

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C” autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, Gołaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 55%, polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zgromadzeniu i przeglądzie literatury, udziale w oznaczeniach badanych parametrów, interpretacji wyników, opracowaniu wniosków, napisaniu i przygotowaniu pracy do publikacji.
2. „Liver function in COVID-19 infection” autorów Przekop D, Gruszewska E, Chrostek L., opublikowanej w *World Journal of Hepatology*, 2021, 13(12), 1909-1918, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 60%. polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i przeglądzie literatury, analizie i interpretacji danych zawartych w publikacjach oraz opracowaniu części manuskryptu.


Podpis

13. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oryginały oświadczeń współautorów wchodzące w skład rozprawy doktorskiej znajdują się w przedmiotowej dokumentacji w Dziekanacie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim w Białymstoku.

Prof. dr hab. Lech Chrostek
imię i nazwisko współautora

Białystok, 2022-03-17
miejsce, data

Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C” autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, Gołaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 5%. polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej oraz ocenie ostatecznej wersji manuskryptu.
2. „Liver function in COVID-19 infection” autorów Przekop D, Gruszewska E, Chrostek L, opublikowanej w *World Journal of Hepatology*, 2021, 13(12), 1909-1918, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 20%. polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej oraz ocenie ostatecznej wersji pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Dagmarę Przekop publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Prof. dr hab. n. med. Lech Chrostek
C-15330
DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA
szce. w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej

Dr hab. Bogdan Cylwik
imię i nazwisko współautora

Białystok, 2022-03-17
miejsowość, data

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatrycznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

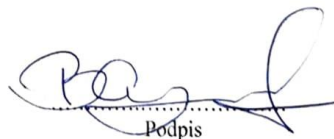
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C”
autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, Gołaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 5%. polegał na ustaleniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej oraz ocenie ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Dągmę Przekop publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Podpis

Prof. dr hab. Anatol Panasiuk
imię i nazwisko współautora

Białystok, 2022-03-17
miejscowość, data

1. Zakład Medycyny Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
2. Oddział Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych
z Ośrodkiem Diagnostyki i Leczenia Endoskopowego
Wojewódzki Szpital Zespolony w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C”
autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A, Gołaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ”Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 5%. polegał na interpretacji i dyskusji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Dagmarę Przekop publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Podpis

0362408 Prof. dr hab. med. ANATOL PANASIUK
specjalista chorób zakaźnych,
medycyny morskiej i tropikalnej,
zdrawia publicznego
choroby zakaźne, patomorfologia

Dr hab Ewa Gruszevska
imię i nazwisko współautora

Białystok, 2022-03-17
miejscowość, data

Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C” autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszevska E, Gietka A, Panasiuk A, Gołaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ”Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 5%, polegał na wykonaniu oznaczeń badanych wybranych parametrów.
2. „Liver function in COVID-19 infection” autorów Przekop D, Gruszevska E, Chrostek L, opublikowanej w *World Journal of Hepatology*, 2021, 13(12), 1909-1918, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ”Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 20%. polegał na zebraniu i przeglądzie literatury oraz opracowaniu części manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Dągmę Przekop publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

..Ewa..Gruszevska..
Podpis

Dr Sławomir Gołaszewski
imię i nazwisko współautora

Białystok, 2022-03-17
miejsowość, data

Oddział Chirurgii Ogólnej,
Małoinwazyjnej i Onkologicznej
Wojewódzki Szpital Zespolony w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C”
autorów: Przekop D, Kłapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A,
Gołaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021,
10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ”Nieinwazyjne testy w diagnostyce
włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia
wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 5%. polegał na zgromadzeniu i przeglądzie
literatury niezbędnej do przygotowania publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Damarę Przekop publikacji
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne.


Sławomir Gołaszewski
specjalista chirurgii ogólnej
specjalista chirurgii onkologicznej
5065158


Podpis

Dr Jakub Klapaczynski
imię i nazwisko współautora

Warszawa, 2022-03-17
miejsce, data

Klinika Chorób Wewnętrznych i Gastroenterologii,
Centralny Szpital Kliniczny MSWiA w Warszawie

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C”
autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszcwska E, Gietka A, Panasiuk A,
Golaszewski S, Cyliwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021,
10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Niemaloznaczne testy w diagnostyce
włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia
wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 10 %. polegał na zebraniu i zabezpieczeniu
próbek krwi do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Dagnarę Przekop publikacji
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne.


Podpis

Dr Andrzej Gietka
imię i nazwisko współautora

Warszawa 2022-03-17
miejsce, data

Klinika Chorób Wewnętrznych i Gastroenterologii,
Centralny Szpital Kliniczny MSWiA w Warszawie

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C”
autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszewska E, Gietka A, Panasiuk A,
Gołaszewski S, Cyliwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021,
10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Niewazyjne testy w diagnostyce
włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia
wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 5% polegał na kwalifikacji pacjentów do
badań i nadzorze nad zebraniem materiału do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Dagmarę Przekop publikacji
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne.



Podpis

Mgr Agnieszka Mucha
imię i nazwisko współautora

Białystok, 2022-03-17
miejsowość, data

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Non-invasive indirect markers of liver fibrosis after interferon-free treatment for hepatitis C” autorów: Przekop D, Klapaczynski J, Grytczuk A, Gruszevska E, Gietka A, Panasiuk A, Gołaszewski S, Cylwik B, Chrostek L. opublikowanej w *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10, 3951, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ”Nieinwazyjne testy w diagnostyce włóknienia w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz uszkodzenia wątroby w zakażeniu SARS-CoV-2”, wynoszący 5%, polegał na wykonaniu oznaczeń badanych wybranych parametrów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Dagmarę Przekop publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Agnieszka Mucha
.....
Podpis