

Proteinski čipovi za predikciju jetrene fibroze i ciroze kod kronične infekcije hepatitisom B

Prediction of liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B infection by serum proteomic fingerprinting

Maro Bujak

Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu

Primljeno: 23. 2. 2009.

Prihvaćeno: 31. 3. 2009.

Adresa za dopisivanje:

Maro Bujak, dipl. ing.,
Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,
Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb
e-mail: mbujak@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

SAŽETAK. Cilj: Većina neinvazivnih metoda (modela) za predikciju i dijagnosticiranje jetrene ciroze komplicirana je i nedovoljno osjetljiva, stoga je cilj istraživanja opisanog u ovom radu bio odrediti proteinski profil seruma koji je karakterističan za cirozu jetara te na temelju takvog profila razviti proteomski model za neinvazivno dijagnosticiranje ciroze jetara. **Metode:** Proteini izolirani iz seruma četrdeset šest bolesnika s kroničnim hepatitisom B kvantitativno su profilirani uz pomoć metode SELDI-mikročipova (engl. *surface-enhanced laser desorption/ionization protein chip arrays*). Dobiveni proteinski profili bili su u direktnoj korelaciji s cirozom jetara te su upotrijebljeni u izradi tzv. modela mreže neurona (engl. *artificial neural network, ANN*), na temelju kojeg se može izračunati indeks fibroze s vrijednostima od 0 do 6. **Rezultati:** Vrijednosti koje su dobivene nakon analize trideset seruma pokazale su kako su proteinski profili u značajnoj korelaciji sa stupnjem fibroze. **Zaključak:** Iz seruma bolesnika s fibrozom jetara moguće je dobiti jedinstven proteinski profil karakterističan za ovo patološko stanje. Indeks fibroze ANN koji je dobiven na temelju proteinskog profila može ukazati na različite stupnjeve fibroze, te se na taj način neinvazivnom metodom mogu jednako dobro predvidjeti i fibroza i ciroza kod bolesnika zaraženih hepatitisom B.

Ključne riječi: ciroza jetara, hepatitis B, mikročip, proteinski profil, SELDI

ABSTRACT. Aim: Most noninvasive predictive models of liver fibrosis are complicated and have suboptimal sensitivity. The study described in this paper was designed to identify serum proteomic signatures associated with liver fibrosis and to develop a proteome-based fingerprinting model for prediction of liver fibrosis. **Methods:** Serum proteins from 46 patients with chronic liver hepatitis B were profiled quantitatively on surface-enhanced laser desorption/ionization protein chip arrays. This liver fibrosis-associated proteomic fingerprint was used to construct an artificial neural network (ANN) model that produced a fibrosis index with a range of 0-6. **Results:** Values for 30 serum proteomic features were significantly associated with the degree of fibrosis. **Conclusions:** A unique serum proteomic fingerprint is present in the sera of patients with fibrosis. An ANN fibrosis index derived from this fingerprint could differentiate between different stages of fibrosis and predict fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B.

Keywords: hepatitis B, liver cirrhosis, protein profile, protein chip arrays, SELDI

UVOD

Fibroza jetara prisutna je kod mnogih kroničnih oboljenja jetara, a njezina glavna odlika je prekomjerno stvaranje kolagena i proteina izvanstaničnog matriksa. Kod određenog broja bolesnika s cirozom jetara zaraženih kroničnim hepatitisom B ili hepatitisom C razvija se i primarni tumor jetara¹. Uznapredovala fibroza uzrokuje cirozu, portalnu hipertenziju i zatajenje rada jetara, što u konačnici zahtijeva transplantaciju². Danas se smatra kako su jetrene fibroze i ciroze reverzibilne, stoga je točna dijagnoza važna za liječenje bolesnika oboljelih od kroničnog hepatitisa B i hepatitisa C³. Histološka analiza dobivena biopsijom jetara danas predstavlja metodu odabira za određivanje stupnja fibroze, iako su njezine glavne mane invazivnost, rizičnost i varijabilnost među uzorcima^{4,5}. Dijagnostička preciznost, naime, ovisi o veličini uzorka dobivenog biopsijom^{5,6}, stoga se u novije vrijeme mnogo pažnje pridaje neinvazivnoj metodi analize seruma bolesnika oboljelih od ciroze jetara. Forns i sur. su, primjerice, razvili sustav indeksiranja fibroze koji se temelji na starosnoj dobi bolesnika, broju trombocita, količini kolesterola i koncentraciji γ -glutamilttransferaze u serumu⁷. Slične načine indeksiranja su razvile i druge skupine istraživača. Analize seruma se stoga uspješno mogu koristiti za određivanje i praćenje jetrenih fibroza kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C, a slični modeli se koriste i za kronični hepatitis B, stoga bi analiza čitavog proteoma seruma mogla pomoći u razjašnjavanju mehanizama ciroze jetara i fibroze, kao i omogućiti pronalazak novih modaliteta liječenja. Naime, uz pomoć globalne proteomske analize te usporedbom uzoraka seruma iz oboljelih i zdravih bolesnika moguće je pronaći biomarkere seruma za bolesti jetara. Tzv. SELDI-mikročip tehnologija (engl. *surface-enhanced laser desorption/ionization protein chip arrays*) proteomska je metoda koja se primjenjuje u dijagnostičke svrhe, te je pogodna i za analizu proteomskog profila seruma bolesnika oboljelih od različitih bolesti, uključujući tumorske bolesti i infektivne bolesti. Cilj istraživanja opisanog u ovome radu bio je odrediti proteinski sastav (profil) seruma koji je karakterističan za različite stupnjeve ciroze jetara uz pomoć metode SELDI-mikročip, te na temelju dobivenih re-

zultata razviti neinvazivni proteomski model za predviđanje i dijagnostiku jetrene fibroze i ciroze kod bolesnika zaraženih kroničnim hepatitisom B.

MATERIJALI

UZORCI

Uzorci biopsije jetara dobiveni su od bolesnika s kroničnim hepatitisom B. Također su bili uključeni i bolesnici na koje se prema laboratorijskim i radiološkim nalazima sumnjalo da imaju oboljenje je-

Implementacija metode proteinskog čipa u kliničku praksu moguća je, te će u budućnosti zamijeniti invazivne metode dijagnosticiranja, primjerice metodu biopsije. Rezultati koji su dobiveni analizom seruma bolesnika s kroničnom infekcijom hepatitisa B oboljelih od jetrene fibroze i ciroze uz pomoć proteinskih čipova pouzdani su i reproducibilni.

tara. Svi bolesnici u vrijeme prikupljanja uzoraka nisu bili podvrgnuti nikakvom liječenju te su imali dijagnosticirane slične stadije bolesti. Prije same biopsije, bolesnicima je izvađena i krv. Bolesnici nisu konzumirali hranu šest sati prije davanja krvi. Serumski su pohranjeni na -70°C prije SELDI-čip analize. Za analizu su nasumično izabrani uzorci seruma od 46 bolesnika (35 muškaraca i 11 žena prosječne starosti 48,3 godine).

HEMATOLOŠKI I BIOKEMIJSKI TESTOVI

Kompletne krvne analize i koagulacijski testovi za svih 46 bolesnika napravljeni su na dan biopsije. Pri tome se koristio brojač krvnih stanica GEN-S i analizator Amax Mechanical CS 190 Coagulation Analyser (Sigma Diagnostics). Na dan biopsije kod 30 bolesnika napravljen je test funkcije jetara. Koncentracije bilirubina, ukupnih proteina, albumina, alanin transaminaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP) izmjerene su s kemoiluminometrijskim imunotestom (ACS 180 analyzer, Chiron Diagnostics).

HISTOLOŠKO BOJANJE

Biopsije jetara su rađene noževima Temno, veličine 16 (Bauer Medical). Uzorci su fiksirani u formalinu, uklopljeni u parafin i bojani metodom hematoksili-eozin. Fibroza jetara određena je uz

pomoć Ishakovog proračuna prema kojem je 10 bolesnika imalo minimalnu fibrozu, 9 bolesnika blagu fibrozu, 10 bolesnika umjerenu fibrozu te 8 bolesnika tešku fibrozu i nepotpunu cirozu, dok je 9 bolesnika imalo cirozu.

PROTEOMSKO PROFILIRANJE SERUMA

Uzorci seruma analizirani su pomoću sustava za SELDI-čip (Ciphergen Biosystems). Dobiveni su kvantitativni proteomski profili s molekulskim masama od 0.9 do 250 kDa. Svi uzorci analizirani su naslijepo bez prethodne kvalifikacije o stupnju fibroze. Ukratko, 2 μ l svakog uzorka denaturirano je u 4 μ l otopine U9 (9 mol/L urea; 20 g/L CHAPS, 50 mmol/ Tris-HCL, pH 9) te potom razrijeđeno s 34 μ l vezujućeg pufera T4 (50 mmol/natij acetat, 1 ml/L Triton X-100 pH 4) ili vezujućeg pufera T9 (10 mmol/L Tris, 1ml/L Triton X-100, pH 9). Protein čip CM10 prethodno je ekvilibriran dva puta po 5 min s 5 μ l vezujućeg pufera, a nakon toga je na pločicu dodano 5 μ l razrijeđenog uzorka u duplikatu. Uzorci su inkubirani uz miješanje na sobnoj temperaturi 90 min, nakon čega je svaka pločica isprana 5 puta vezujućim puferom te isprana dva puta deioniziranom vodom. Nakon sušenja na zraku na uzorku je nanesen matriks. Signal na proteinskom čipu očitavan je uz pomoć čitača PBS II, a proteinski vrškovi su identificirani i kvantificirani uz pomoć programa Ciphergen Biomarker Wizard.

IDENTIFIKACIJA PROTEINSKIH KARAKTERISTIKA POVEZANIH SA STANJEM FIBROZE

Za identificiranje proteinskih karakteristika povezanih s fibrozom korišteni su sljedeći kriteriji: a) normalizirane gustoće proteinskih vrškova morale su biti značajno više/nije kod bolesnika s tipičnom fibrozom/cirozom nego kod bolesnika s minimalnom fibrozom; b) normalizirane gustoće proteinskih vrškova moraju korelirati sa stupnjem bolesti.

PREDIKTIVNI MODEL NEURONSKE MREŽE

Na temelju dobivenih podataka modelirana je neuronska mreža (engl. *artificial neural network*, ANN) za predikciju jetrene fibroze. Dva su modela ANN razvijena na temelju dobivenih proteomskih rezultata koje je bilo moguće povezati s cirozom

jetara. Prvi se model temelji na proteinskim rezultatima kao ulaznoj varijabli, dok drugi model uključuje i parametre kao što su dob, spol, broj trombocita, broj leukocita, hemoglobin, djelomično vrijeme aktivacije tromboplastina, koncentraciju bilirubina, koncentraciju proteina, koncentraciju albumina, koncentraciju alanin transaminaze (ALT), koncentraciju alkalne fosfataze (ALP) i koncentraciju α -fetoproteina.

STATISTIČKA ANALIZA

Korelacija između Ishakovih pogodaka (engl. *scores*) i fibroznog indeksa određenog uz pomoć ANN utvrđena je uz pomoć Spearmanovog korelacijskog testa. Bolesnici su podijeljeni u pet studijskih skupina: minimalna fibroza (Ishakov pogodak = 1), blaga fibroza (Ishakov pogodak = 2), umjerena fibroza (Ishakov pogodak = 3 ili 4), teška fibroza i nepotpuna ciroza (Ishakov pogodak = 5) te ciroza (Ishakov pogodak = 6).

REZULTATI

PROTEOMSKI PROFIL SERUMA POVEZAN SA STUPNJEVIM BOLESTI

U serumu je identificirano 749 vrsta proteina: 383 je identificirano uz pomoć vezujućeg pufera pH 4 dok je 411 identificirano uz pomoć vezujućeg pufera pH 9. Od ukupnog broja proteina 31 protein imao je povećanu ekspresiju dok je 50 proteina imalo smanjenu ekspresiju u skupini bolesnika s tipičnom fibrozom/cirozom. Od 81 proteina, 6 proteina pokazalo je pozitivnu korelaciju sa stupnjem fibroze, dok je 24 proteina imalo negativnu korelaciju sa stupnjem fibroze. Upravo su ti proteini iskorišteni za utvrđivanje proteomskog profila koji je karakterističan za fibrozu.

KORELACIJA UPALE S FUNKCIJOM JETARA

Od ukupnog broja proteina koji su imali negativnu ili pozitivnu korelaciju sa stupnjem fibroze ($n = 30$), 4 proteina bila su u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom albumina, 6 proteina imalo je negativnu korelaciju s parcijalnim vremenom aktivnosti tromboplastina, dok ih je ukupno 9 bilo u negativnoj korelaciji s Međunarodnim normalizacijskim omjerom (engl. *International Normalized Ratio*). Nakon završne obrade pokazalo se kako je

14 proteina u pozitivnoj korelaciji s funkcijom jetara. Samo je jedan protein, međutim, pokazao pozitivnu korelaciju s koncentracijom ALT, iako taj isti protein nije korelirao s markerima funkcije jetara. Nijedna od proteomskih karakteristika nije korelirala s koncentracijom ALP. Zaključno, 50% proteina koji su se mogli povezati s fibrozom jetara nije bilo moguće dovesti u pozitivnu korelaciju s funkcijom jetara i upalom.

KORELACIJA FIBROZNOG INDEKSA ANN SA STUPNJEM FIBROZE

Za određivanje stupnja fibroze razvijena su dva modela ANN uz pomoć kojih se utvrdio tzv. fibrozni indeks ANN. Prvi model temeljio se na proteomskim podacima kao ulaznim varijablama, dok je drugi model osim proteinskih rezultata u obzir uzimao kliničke i laboratorijske vrijednosti za svakog pojedinog bolesnika. Za svaku je ulaznu varijablu prethodno određena tzv. relativna važnost u modelima te je shodno tome za svaki model odabrano ukupno deset varijabli. Za evaluaciju oba modela ANN, fibrozni indeks ANN podvrgnut je pojedinačnoj unakrsnoj validaciji. Distribucijske vrijednosti fibroznog indeksa ANN dobivene uz pomoć oba modela bile su vrlo slične. Naime, statističke su analize potvrdile kako se fibrozni indeksi ANN značajno razlikuju između skupina bolesnika s obzirom na status fibroze, odnosno, za oba modela ANN postoji snažna pozitivna korelacija između fibroznog indeksa ANN i Ishakovih pogodaka. Ovi rezultati pokazuju kako su fibrozni indeksi ANN u visokoj korelaciji sa stupnjem fibroze te kako su oni značajno različiti kod bolesnika koji su razvili različite stupnjeve fibroze.

FIBROZNI INDEKS ANN MOŽE POSLUŽITI ZA PREDVIĐANJE FIBROZE I CIROZE

Analiza ROC (engl. *receiver operating characteristic*) pokazala je kako je fibrozni indeks ANN dobiven iz proteinskog profila seruma bolesnika (ANN model 1) bio u velikom postotku u skladu s rezultatima biopsije, te je, dakle, imao visoku prediktivnu i dijagnostičku vrijednost. Zanimljivo je, ali i očekivano, da se točnost predikcije povećavala sa stupnjem fibroze. Svi su slučajevi s teškom fibrozom, naime, točno dijagnosticirani. Analiza ROC pokazala je kako uključivanje u proračun parameta-

tara poput ALT, ukupnih proteina, bilirubina, hemoglobina i Međunarodnim normalizacijskim omjerom kao ulaznih varijabli znatno poboljšava dijagnostičku snagu modela ANN.

RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Klasična histološka analiza biopsija jetara odlična je metoda za određivanje stupnja nekroinflammatorne aktivnosti i utvrđivanja veličine fibroze^{8,9}. No osim relativnog troška ovakve analize, ne treba zanemariti i povezanost biopsije s rizikom teških komplikacija. Biopsija jetara stoga zasigurno ne predstavlja metodu odabira za redovito praćenje razvoja bolesti. U opisanom istraživanju koje su proveli Poon i sur. pokušala se stoga pronaći adekvatna metoda za predikciju fibroze jetara kao i za predikciju nastanka ciroze. Autori su zaključili kako je upravo neinvazivna analiza proteinskog profila ekspresije u serumu odgovarajuća neinvazivna metoda za dijagnosticiranje fibroze i ciroze¹. Istraživanje je pokazalo kako se trideset proteina seruma može direktno povezati s fibrozom jetara. Potrebno je, međutim, provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdio točan identitet proteina s obzirom na to da se uz pomoć korištene metode SELDI-čipa mogu identificirati samo mase proteina, odnosno proteinski profil ekspresije. Takvu je naknadnu analizu rezultata moguće provesti uz pomoć masenog spektrometra MALDI-TOF¹⁰, s obzirom na to da svaki identificirani vršak utvrđen uz pomoć SELDI-čipa ima jedinstveni omjer vrijednosti mase i naboja (m/z). Tehnologija proteinskog čipa SELDI-TOF, dakle, nije učinkovita u identifikaciji proteina kao neke druge proteinske metode, no SELDI-TOF posjeduje prednosti koje ga čine izuzetno zanimljivim u proteomskim istraživanjima. Prije svega, proteinski čipovi su različite kromatografske površine koje omogućavaju dobro razdvajanje proteina iz smjese s obzirom na njihova fizikalno-kemijska svojstva. Kromatografske površine čipa sastoje se od hidrofobnih i hidrofilnih dijelova, ionskih izmjenjivača i vezujućih metala, a na površini čipa su pričvršćena protutijela, receptori ili oligonukleotidi koji služe kao "mamci" za proteine iz uzorka. Biološki uzorci, bilo da se radi o staničnim lizatima, ekstraktima tkiva ili biološkim tekućinama, nanose se na proteinski čip pri čemu se proteini vežu na temelju svog kromatografskog afiniteta. Nevezani

proteini se ispiru, a vezani se proteini analiziraju i detektiraju¹¹. Te osobine čine metodu SELDI-TOF izuzetno osjetljivom, što je idealno za analizu uzoraka malih volumena, te osiguravaju detekciju proteina malih molekularnih masa i dobro razdvajanje smjese proteina/skupina proteina kao i analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. Ova je metoda posebno pogodna za analizu biomarkera jer specifično razdvajanje smjese proteina prije analize umanjuje gubitak uzorka i omogućava ionizaciju onih proteina koja ne bi bila direktno mogu-

Metoda SELDI-TOF izuzetno je osjetljiva, što je čini idealnom metodom za analizu uzoraka malih volumena i detekciju proteina malih molekularnih masa, stoga ne čudi da se ova metoda sve više koristi za analizu biomarkera; specifičnost i osjetljivost dijagnoze tim je veća što je veći skup dijagnostičkih biomarkera.

ća u samoj smjesi¹². Metoda SELDI-TOF pokazala se posebno uspješnom u otkrivanju i identifikaciji inhibitora replikacije virusa HIV-a¹³. SELDI-TOF se također uspješno primjenjuje u istraživanju tumora i pronalaženju novih biomarkera u ekspresijskim profilima seruma ili uzoraka tkiva oboljelih. Dokazano je, naime, kako je specifičnost i osjetljivost dijagnoze tim veća što je veći skup dijagnostičkih biomarkera. Primjerice, Wright i sur. otkrili su kako proteomski profil utvrđen uz pomoć metode SELDI-TOF ima devet proteina, te time veću specifičnost (97%) i osjetljivost (83%) dijagnoze tumora prostate nego primjenom klasičnog dijagnostičkog testa na PSA (engl. *prostate specific antigene test*). Slični su rezultati dobiveni i za tumore dojke i jajnika¹⁴. Dok je proteinski profil seruma neizmjerljivo važan za rano otkrivanje tumora, za konačnu potvrdu i određivanje stadija koristi se tumorsko tkivo. Budući da je tumorsko tkivo izuzetno heterogeno, potrebne su nove molekularne tehnike za istraživanje novih tkivnih biomarkera. Jedna od takvih metoda je i mikrodisekcija laserom (engl. *laser capture microdissection*, LCM) uz pomoć koje je moguće izolirati čistu populaciju tumorskih stanica. Upravo kombinacijom ovih dviju metoda utvrđen je niz biomarkera specifičnih za oboljelo i zdravo tkivo kao i markeri karakteristični za pojedinu fazu razvoja tumora^{15,16}. Metoda SELDI-TOF MS ko-

risti se vrlo uspješno i u istraživanju proteinskih interakcija s ostalim molekulama (protein/protein, protein/DNA, protein/metabolit ili identifikacija afinitetnog vezanja), pri čemu se ne mijenjaju niti integritet niti trodimenzionalna struktura proteina. Zaključno, metoda SELDI-TOF MS uvelike će pridonijeti boljoj dijagnostici bolesnika oboljelih od fibroze jetara. Dva modela ANN razvijena u opisanom istraživanju predstavljaju odličan alat za predikciju fibroznog indeksa. Rezultati istraživanja čvrsto dokazuju kako je algoritam ANN koristan za predikciju fibroze i ciroze jetara na temelju proteomskog profila seruma. Važno je naglasiti kako su potrebna dodatna istraživanja koja bi ispitala vrijednost modela ANN za predikciju fibroze i ciroze kod bolesnika s kroničnim hepatitisom B. U ovom istraživanju utvrđeno je kako samo polovica od trideset utvrđenih proteina ima pozitivnu korelaciju s funkcijom jetara i upalom, što upućuje na promjenu i nekih drugih fizioloških parametara. Ovakvi rezultati ne iznenađuju s obzirom na to da je poznata činjenica kako fibroblasti u tkivu ulaze u interakciju s ekstracelularnim matriksom, pa tako i različitim faktorima koji mogu ali i ne moraju biti povezani s upalom. Ti faktori su, primjerice, ishemija, serotonin, endotelin, trombin, leptin i još mnogi drugi¹⁷. Oni, naime, utječu na proliferaciju fibroblasta, stvaranje kolagena i sintezu enzima metaloproteinaza matriksa, ekspresiju različitih receptora, parakrino i autokrino izlučivanje citokina, kemokina te ostalih faktora rasta, uključujući i one direktno vezane uz regulaciju fibroze. Interakcije s ekstracelularnim matriksom, posebno u trodimenzionalnom prostoru, također su vrlo bitne za funkcioniranje fibroblasta u oboljeloj i zdravom tkivu. Uz sve navedeno, fibroblasti ulaze u interakciju i s nizom stanica poput neutrofila, makrofaga, T-stanica, eozinofila i masnim stanicama te su osjetljivi na čitav niz citokina i kemokina koje ponekad i sami luče. Korištenje novih tehnologija, poput metode SELDI-TOF, moglo bi pomoći u rasvjetljavanju njihove kompleksne uloge u različitim fibrozama i upalnim procesima¹⁸, stoga bi istu tehnologiju i analitički pristup, kao ovaj opisan u radu, trebalo ispitati i na bolesnicima koji boluju od različitih kroničnih bolesti jetara i utvrditi općenitu povezanost pojave fibroze s etiologijom bolesti.

ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa 098-0982464-2393 i projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809.

LITERATURA

1. Poon TCW, Hui AY, Chan HLY, Ling Ang I, Man Chow S, Wong N et al. Prediction of liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B infection by serum proteomic fingerprinting: A pilot study. *Clinical Chemistry* 2003;51:328-35.
2. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.
3. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38:S38-53.
4. Grant A, Neuberger J. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice. *British Society of gastroenterology. Gut* 1999;45:IV1-11.
5. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:1449-57.
6. Scheuer PJ. Liver biopsy size matters in chronic hepatitis bigger is better. *Hepatology* 2003;38:1356-8.
7. Fornis X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-92.
8. Soloway RD, Baggenstoss AH, Schoenfield LJ, Summerskill WH. Observer error and sampling variability tested in evaluation of hepatitis and cirrhosis by liver biopsy. *Am J Dig Dis* 1971;16:1082-6.
9. Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S152-60.
10. Vorderwulbecke S, Cleverley S, Weinberger SR, Wiesner A. Protein quantification by the SELDI-TOF-MS based ProteinChip System. *Nature Methods* 2005;2:395.
11. Mazzatti DJ, Pawelec G, Longdin R, Powell JR and Fin-Corsey RJ. SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of T-cell clones propagated in long-term culture identifies human profilin-I as a potential bio-marker of immunosenescence. *Proteome science* 2007;5:7.
12. Fontana S, De Leo G, Sedic M, Kraljevic Pavelic S, Alessandro R. Proteomics in antitumor research. *DDT: technologies* 2006;3:441-9.
13. Zhang L, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, Dalmaso EA et al. Contribution of human α -defensin 1,2 and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science Express* 2002;298:995-1000.
14. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.
15. Paweletz CP, Gillespie JW, Ornstein DK, Simone NL, Brown MR, Cole KA et al. Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip. *Drug development research* 2000;49:34-42.
16. Wright Jr GL, Cazares LH, Leung SM, Nasim SM, Adam BL, Yip TT et al. ProteinChip surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: A novel proteinbiochip technology for detection of prostate cancerbiomarkers in complex protein mixtures. *Prostate cancer Prostatic Dis* 1999;2:264-76.
17. Atamas SP. Complex regulation of tissue fibrosis. *Life science* 2002;72:631-43.
18. Reddy G, Dalmaso EA. SELDI ProteinChip Array Technology: Protein-Based Predictive medicine and Drug Discovery Applications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2003;4:237-41.