

Zbigniew Krawczuk

„Ekspresja izoform metalotioneiny w hepatocytach w wirusowym zapaleniu wątroby typu B oraz C”

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby jest chorobą trwającą ponad 6 miesięcy, spowodowaną infekcją wirusem HBV (w przypadku WZW B) lub HCV (w przypadku WZW C). Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że 1/3 populacji ludzkości miała styczność z wirusem HBV, z czego ponad 350 milionów choruje na przewlekłe postaci chorób wątroby o tej etiologii. W Polsce chorych na przewlekłe WZW B szacuje się na około 350–400 tysięcy. Z kolei zakażenie wirusem HCV dotyczy około 3% ludności na świecie – występuje ono u ponad 170 milionów ludzi. W Polsce częstość tych infekcji wynosi około 1,9%. Biorąc pod uwagę powyższe, przewlekłe wirusowe zapalenia wątroby są istotnymi problemami klinicznymi.

Metalotioneiny (MT) to wewnątrzkomórkowe białka o niskiej masie cząsteczkowej, gdzie jedną trzecią sekwencji aminokwasów stanowią reszty cysteiny. Charakterystyczną właściwością wszystkich białek z rodziny MT jest wiązanie przez nie jonów metali ciężkich, takich jak np.: cynk, miedź, rtęć, ołów czy kadm. Białka te wiążą wolne jony ww. metali w nieaktywne kompleksy, dzięki czemu pełnią kluczową rolę w ochronie komórek organizmu przed negatywnym działaniem metali ciężkich. Ponadto, MT ze względu na dużą ilość reszt cysteinowych zawartych w swojej budowie, wykazują silne właściwości antyoksydacyjne, stanowiąc jeden z głównych elementów ochrony komórek przed negatywnym wpływem reaktywnych form tlenu. Znane są doniesienia sugerujące udział MT w przewlekłym procesie zapalnym – obserwuje się wzrost ekspresji MT w przypadku narażenia hepatocytów na ww. czynniki stresowe, a także działanie cytokin zapalnych takich jak np. IL-1 oraz IL-6, co może zmniejszać szkody wywoływane przez te czynniki.

Celem moich badań było zbadanie ekspresji izoform MT I oraz II na poziomie mRNA oraz białka w hepatocytach pacjentów zakażonych wirusami HBV i HCV oraz prawidłowej tkance wątroby. Ponadto celem było skorelowanie uzyskanych rezultatów z danymi klinicznymi pacjentów z wirusowymi zapaleniami wątroby typu B i C.

Materiał do przeprowadzonych eksperymentów stanowiły fragmenty bioptatów wątroby, częściowo utrwalone w formalinie a następnie zabezpieczone w postaci bloczków parafinowych, częściowo zaś utrwalone w płynie RNAlater.

Zgromadzony materiał badawczy stanowiło: 29 biopsji wątroby pochodzących od pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby (11 pacjentów z WZW B oraz 18 pacjentów z WZW C), dla których kontrolę stanowiło 9 biopsji tkanki wątroby bez zmian morfologicznych pochodzących od pacjentów z hepatopatią nieznanego pochodzenia.

Na skrawkach parafinowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko MT-I/II. Ocenie podlegał stopień ekspresji jądrowej i cytoplazmatycznej białka MT-I/II. Poziom ekspresji mRNA izoform: MT-IA, MT-IB, MT-IE, MT-IF, MT-IG, MT-IH MT-IX oraz MT-IIA, określany był za pomocą techniki Real-Time PCR. Uzyskane rezultaty analizowałem w odniesieniu do danych klinicznych (wiek, płeć, obecność stłuszczenia lub powiększonej wątroby, wyniki wybranych badań biochemicznych, parametrów morfologii oraz układu krzepnięcia).

Wykazałem cytoplazmatyczną i jądrową ekspresję MT-I/II w hepatocytach zarówno pacjentów z WZW B, WZW C jak i grupy kontrolnej. Opisana ekspresja była istotnie wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej. Ekspresja izoform MT-IG, MT-IX oraz MT-IIA była wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą badaną, natomiast MT-IE oraz MT-IH była z kolei wyższa w grupie badanej. Nie wykazano różnic w ekspresji

izoform MT-IA, MT-IB, MT-IF w badanych podgrupach. Nie stwierdzono również istotnych różnic w ekspresji wszystkich badanych markerów pomiędzy pacjentów zakażonych HBV czy HCV. Dodatkowo, izoformy MT korelują ujemnie z markerami biochemicznymi uszkodzenia wątroby.

W oparciu o przeprowadzone badania stwierdziłem ekspresję MT-I oraz MT-II w prawidłowej tkance wątroby jak również pacjentów z przewlekłym WZW B i C, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Ponadto wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują na potencjalną aktywność ochronną wyższej ekspresji MT na hepatocyty objęte przewlekłym procesom zapalnym o etiologii wirusowej.

Summary of dissertation

Chronic viral hepatitis is a disease that lasts more than 6 months, infected with HBV (in the case of hepatitis B) or HCV (in the case of hepatitis C). The World Health Organization estimates that 1/3 of the human population has had contact with HBV, of which over 350 million suffer from chronic forms of liver disease of this etiology. In Poland, patients with chronic hepatitis B are estimated at around 350,000–400,000. In turn, HCV infection affects about 3% of the world's population - it occurs in over 170 million people. In Poland, the frequency of these infections is about 1.9%. Considering the above, chronic viral hepatitis is a significant clinical problem.

Metallothioneins (MTs) are low molecular weight intracellular proteins in which up to one third of the protein's amino acid sequence consists of cysteine. A characteristic feature of all proteins from the MT family is the binding of heavy metal ions, such as, zinc, copper, mercury, lead or cadmium. These proteins bind free ions of the above-mentioned metals into inactive complexes, and play a key role in protecting the body's cells against the negative effects of heavy metals. Moreover, due to the large number of cysteine residues contained in its structure, MT exhibit strong antioxidant properties, being one of the main elements of cell protection against the negative effects of reactive oxygen species. There are reports suggesting the participation of MT in the chronic inflammatory process - an increase in MT expression is observed when hepatocytes are exposed to the above-mentioned stress factors, as well as the action of inflammatory cytokines such as IL-1 and IL-6, which may reduce the damage caused by these factors.

The aim of my research was to investigate the expression of MT I and II isoforms at the mRNA and protein level in hepatocytes of patients infected with HBV and HCV

viruses and in control liver tissue without pathology. Moreover, the aim was to correlate the obtained results with clinical data of patients with hepatitis B and C.

The material for the experiments were fragments of liver biopsies, partially fixed in formalin and then protected in the form of paraffin blocks, partially fixed in RNAlater.

The collected research material consisted of: 29 liver biopsies of patients with chronic viral hepatitis (11 patients with hepatitis B and 18 patients with hepatitis C), for which 9 biopsies of control liver tissue obtained from patients with hepatopathy of unknown origin but without any pathology in microscopic examination.

Immunohistochemical reactions were performed on paraffin sections with the use of anti-MT-I/II antibodies. The degree of nuclear and cytoplasmic expression of MT-I/II protein was assessed. Isoform expression level: *MT-IA*, *MT-IB*, *MT-IE*, *MT-IF*, *MT-IG*, *MT-IH*, *MT-IX* and *MT-IIA* mRNA was determined using the Real-Time PCR technique. I analyzed the obtained results in relation to clinical data (age, sex, presence of steatosis or enlarged liver, results of selected biochemical tests, morphology and the coagulation system parameters).

I have demonstrated cytoplasmic and nuclear expression of MT-I/II in hepatocytes of both hepatitis B and hepatitis C patients and the control group. The described expression was significantly higher in the control group compared to the study group. Expression of *MT-IG*, *MT-IX* and *MT-IIA* isoforms were higher in the control group than in the study group, while *MT-IE* and *MT-IH* were higher in the study group compared to control. There were no differences in the expression of *MT-IA*, *MT-IB*, *MT-IF* isoforms in the studied subgroups. There were also no significant differences in the expression of all investigated markers between patients infected with HBV or HCV. *MT* isoforms negatively correlate with biochemical markers of liver injury.

Based on the conducted research, I found the expression of MT I and II in normal liver tissue as well as in patients with chronic hepatitis B and C, both at the mRNA and protein levels. In addition, the results of my research indicate the potential protective activity of higher MT expression on the liver undergoing chronic inflammatory processes of viral etiology.